LUÍS AUGUSTO ABREU DA CUNHA PASSOS

A sinalização do co-ativador de transcrição PGC-1 β e sua relevância para a
proliferação celular e desenvolvimento de melanoma

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Passos, Luís Augusto Abreu da Cunha

A sinalização do co-ativador de transcrição PGC-1 β e sua relevância para a proliferação celular e desenvolvimento de melanoma / Luís Augusto Abreu da Cunha Passos. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Heraldo Possolo de Souza.

Descritores: 1.PGC-1 β 2.Melanoma 3.Proliferação de células 4.Neoplasias cutâneas

USP/FM/DBD-419/14

Aos amigos e à minha família, por me mostrarem que
sempre posso esperar mais de mim;

À Deus, por ter me dado a vida até agora e pela frente.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

- Isaac Newton -

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, por todos os momentos, conselhos, brincadeiras, jornal clubs, e paciência ao longo destes quatro anos. Obrigado por me dar a oportunidade de crescer pessoal, acadêmica e profissionalmente e mais ainda por acreditar em mim mesmo quando (n) dificuldades, com $p < 0,05$, surgiram.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas não só por ceder tão prontamente as linhagens celulares para a realização deste trabalho, mas também por contribuído com as ideias, discussões, sugestões e até mesmo com aulas sempre que necessário. Meus sinceros agradecimentos por tudo, não teríamos conseguido desenvolver este projeto sem tão ilustre contribuição.

À Prof. Dra. Miriam Sotto, também por ter contribuído não só com amostras e procedimentos, mas pelo auxílio prestado com as análises de lâminas e pela disponibilidade e apoio oferecidos sempre que preciso.

Às Dra. Ana Iochabel e Dra. Márcia Cristiane, pela ajuda nos momentos iniciais, pelas explicações, demonstrações, sugestões, diluições, protocolos e westerns. Tudo que que aprendi e utilizei, de uma maneira ou de outra, foram vocês que estiveram lá para me aconselhar. Muito obrigado.

À Dra. Daniela Oxer, por ter me convidado à realizar Iniciação Científica, também tendo contribuído com os primeiros passos que foram dados nessa longa trajetória.

A todos os funcionários e equipe do LIM 24, em especial ao Rodrigo Aguiar, por terem auxiliado com os experimentos *in vivo*, cedendo tempo, espaço e recursos, inclusive na agenda da cultura celular e do biotério, mesmo quando não havia mais tempo hábil nem para os próprios projetos do laboratório.

Às simpáticas doutoras do laboratório de Reumatologia, que mesmo sem me conhecerem e conviverem diariamente tanto ajudaram cedendo os muitos *shakers* para o cultivo das

bactérias e mais importante ainda: por tantas vezes cederem o precioso gelo para todos os experimentos! Muito obrigado pela simpatia e pela ajuda simples e honesta.

À Suely Ariga e à Tais Lima pelo cuidado com as células, meios, complementos, pH, shRNAs e tudo mais. Sem a parceria e os conselhos de vocês provavelmente as “filhas” teriam tido muito mais dificuldades em se manter do que realmente tiveram.

À Vanessa Jacob, simplesmente por ter partilhado comigo cada passo sofrido das transfecções, maxipreps e finais de semana de seleção celular e ter visto, acompanhado e participado da elaboração de um protocolo que foi de total morte celular ao resultado animador do PCR.

A todos os funcionários do LIM 51, os quais, cada um a sua maneira, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação em todos os sentidos.

Aos meus pais, Ginaldo e Maria Aparecida, por serem pais dedicados por terem colocado minha educação acima de qualquer outra necessidade deles próprios. Espero que um dia eu seja capaz de retribuir à vocês tudo o que fizeram por mim.

À Angélica Abreu da Cunha Passos, minha eterna amiga, fiel companheira e psicóloga nas horas vagas. Seria impossível ter passado por toda esta experiência sem sua presença, carinho, companhia, apoio e tantas outras situações que nem posso enumerar. Obrigado por confiar tanto em mim e me mostrar que sempre há uma via, uma superação, um outro caminho e uma saída. Mais obrigado ainda por ter aceitado estar ao meu lado ‘daqui até a eternidade’. E ainda muito obrigado por curtir os embalos de Final Fantasy à noite! Aishiteru yo!

À Mayara Passos, minha irmã, por ser, concomitantemente, meu espelho e meu reflexo, por buscar inspiração em mim, mas também por o ser. Obrigado por todos os momentos, bons e maus, que nos fizeram ser irmãos em todos os sentidos.

Aos amigos Silvana, Creusa, Wellington, Ariane, Viviane, Arlete, Daniela, Thiago, Thais, Marcel, Bruna, Fernando, Núbia, Márcia, Tânia, Maria Teresa, Sandra, Josefa, Esmeralda, Lucélia, Marina, Deusa, Karina Ribeiro, Karina Silva, Adriana, e tantos outros que não couberam em um espaço tão curto. Obrigado por me fazerem rir, chorar, cantar, dançar, jogar, pesquisar, comer, viajar e outros tantos verbos infinitivos que também estão em demasia para este pequeno agradecimento.

À toda a minha família, todos os primos, tios, avós, e é claro, à família agregada – aos grandes amigos que deram um passo além.

À Fapesp e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus, por até aqui ter me guiado.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Tabelas e Figuras

Resumo

Abstract

1.Introdução	1
1.1. Melanoma enquanto alvo de pesquisa.....	1
1.2. Alterações metabólicas no câncer	3
1.3. O co-ativador de transcrição PGC-1	5
1.4. Distúrbios derivados de alterações na expressão de PGC-1	11
1.5. PGC-1 e Câncer.....	14
2.Hipótese	20
3.Objetivos.....	21
3.1.Geral	21
3.2. Específicos	21
3.2.1. Verificar a expressão de membros da família PGC-1 em células tumorais	21
3.2.2. Determinar a capacidade de proliferação das linhagens tumorais, estabelecendo a variação entre si, assim como na linhagem melanocítica controle.....	21
3.2.3 Determinar se existe alguma relação causal entre a expressão de PGC-1 β e a proliferação de células tumorais.....	21
3.2.4. Determinar se existe correlação entre o crescimento tumoral <i>in vivo</i> e a expressão de PGC-1 β	21
3.2.5. Verificar a expressão de PGC-1 β em amostras de melanoma humano.....	22
3.2.6. Avaliar o silenciamento permanente de PGC-1 β por shRNA.	22
4.Procedimentos Metodológicos	23
4.1. Cultura celular	23
4.2. Determinação de curvas de crescimento	23
4.3. Extração de RNA e PCR	24
4.4. Detecção da expressão proteica por Western Blotting.....	25

4.5. Silenciamento de PGC-1 β por antissenso	26
4.6. Modelo in vivo de melanoma e transfecção de ASO	28
4.7. Análise de amostras humanas	28
4.8. Silenciamento de PGC-1 β por shRNA.....	29
4.9. Análise estatística.....	31
5. Resultados.....	32
5.1. Curva de crescimento e condições de viabilidade em cultura.....	32
5.2. Quantificação da expressão gênica de co-ativadores PGC-1 e seleção de modelo experimental.	33
5.3. Silenciamento Gênico	38
5.4. Avaliação dos efeitos do silenciamento sobre a cadeia de sinalização.	42
5.5. Avaliação dos efeitos do silenciamento sobre a proliferação celular.....	47
5.6. Inoculação de células e tratamento com ASO <i>in vivo</i>	50
5.7. Expressão de PGC-1 β em melanoma humano	55
5.8. Silenciamento <i>in vitro</i> por shRNA.....	58
6. Discussão.....	60
7. Bibliografia.....	80

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMPc	Cyclic Adenosine monophosphate - Monofosfato cíclico de adenosina
APOC3	Alipoprotein C3 - Alipoproteína C3
ATP	Adenosine triphosphate - Adenosina tri-fosfato
BAT	Brown Adipose Tissue - Tecido adiposo marrom
BRAF	B-Raf Proto-oncogene – proto-congene B-Raf quinase de serina/treonina
BSA	Bovine Serum Albumin – Soro Fetal Bovino
nM	nano Molar
CBP/p300	CREB binding protein/E1A binding protein – Proteína ligante ao CREB/proteína ligante ao E1A
Cm	centímetros
CREB	cAMP response element-binding protein – proteína ligante ao elemento responsivo de AMPc
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRIP	Vitamin D receptor Interacting Protein – Proteína responsiva ao receptor de vitamina D
DTIC	Decarbazida
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid – ácido etileno-glicol tetra-acético
ERR	Estrogen Related Receptors – receptores relacionados ao estrógeno
FAS	Fatty acid sintase – ácido graxo sintase
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GCN5	Histone N-acetyltransferase – Histona N-acetiltransferase
GLUT	Glucose Transporter – Transportador de glicose

HAT	Histone acetyltransferase – histona acetil-transferase
HCF-1	Host Cell Factor 1 - Fator de ancoragem celular 1
HNF-4	Hepatocyte Nuclear Factor 4 – Fator Nuclear de Hepatócito 4
IFN	Intérferon
IL	Interleucina
LPL	Lipoproteína Lipase
M	Molar
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases – proteínas-quinase ativadas por mitógenos
MEK	MAPK kinase – proteína quinase de MAPK
MITF	Microphthalmia-associated transcription fator- Fator de Transcrição associado à microftalmia
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – fator nuclear kappa de células B ativadas
NRF	Nuclear Respiratory Factor – Fator de respiração nuclear
OXPHOS	Oxidative Phosphorilation – Fosforilação Oxidativa
PBS	Phosphate Buffer Saline – Tampão Fosfato Salino
PCR	Polymerase chain reaction – Reação em cadeia de polimerase
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase – 6-fosfofruto-2-quinase/fructose-2,6-bifosfatase
PGC-1	PPAR gamma co-activator 1 – Co-ativador de PPARgamma 1
pmol/ml	picomol por mililitro
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride - fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor - receptores ativados por proliferador de peroxissomo
PRC	PGC-1 related co-activator – Co-ativador relacionado ao PGC-1
PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1 – proteína arginine-metil transferase 1
qsp.	Quantidade suficiente para
REDOX	Reduction and Oxidation – reação redução/oxidação
RNA	Ribonucleic acid – ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Reactive Oxygen Species – espécies reativas de oxigênio
RPM	rotações por minuto
SCF	Stem Cell Factor – Fator de célula tronco
SDS	Sodium dodecyl sulfate – duodecil sulfato de sódio
shRNA	RNA short-hairpin
siRNA	RNA small-interfering
SIRT1	NAD-dependent protein deacetylase – Proteína deacetilase NAD-dependete
SOD2	Superoxide dismutase 2 – superóxido dismutase 2
SRC-1	Steroid receptor coactivator-1 – Co-ativador de receptor de esteróides 1
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins - proteínas reguladoras de elemento de ligação á esteróis
TBST	Tris-buffer Saline Tween – Tampão Tris-salino com tween
TFAM	Mitochondrial transcription factor A – Fator de transcrição mitochondrial A
TORC1	Transducer of Regulated CREB activity 1 - Transdutor regulado por atividade de CREB 1
TRAP	Thyroid Hormone Receptor-associated Proteins – proteínas associadas ao receptor de hormônio de tireóide
ug/ml	microgramas por mililitro
UV	Ultraviolet light – Luz ultravioleta

VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1 – proteína celular de adesão vascular 1
VLA-4	Very Late Antigen-4 – Antígeno Muito tardio 4
VLDL	Very-low-density lipoprotein – lipoproteína de muito baixa densidade
μl	microlitro

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1 – Incidência e Mortalidade em função de melanoma maligno entre 1975 e 2005 padronizado por idade. Adaptado de Hauschild e Eggermont (2009).....	2
Figura 2. Regulação da transcrição de PGC-1 α em função de estímulos tecido-específicos..	6
Figura 3. Ação e estrutura dos co-ativadores PGC-1.....	8
Figura 4. Células de linhagens tumorais (Tm1 e Tm5) e melanócitos controle (Ma) foram plaqueados de modo similar e o número de células contado diariamente.	34
Figura 5. O gráfico de sobrevivência celular demonstra que os valores de crescimento obtidos na figura 4 não se devem à mortalidade celular.....	35
Figura 6. As linhagens tumorais Tm1 e Tm5 apresentaram maiores níveis de RNAm para PGC-1 α do que a linhagem controle Ma	36
Figura 7. De modo semelhante ao observado na Figura 6, as linhagens tumorais também apresentam maiores níveis de RNAm para a isoforma β do co-ativador.	37
Figura 8. Níveis reduzidos de RNAm para PGC-1 β podem ser observados em células Tm5 tratadas com o oligonucleotídeo antisense (ASO)	39
Figura 9. Não se observam diferenças significativas entre os grupos quando se analisa a expressão de PGC-1 α	40
Figura 10. Como esperado, a expressão da proteína detectada por Western Blotting segue os padrões obtidos com o RNAm..	41
Figura 11. Avaliação do RNAm de NRF-1..	43
Figura 12. O segundo gene alvo direto de PGC-1 β analisado foi o TFAM.	44
Figura 13. Avaliação do RNAm de APOC3.....	45
Figura 14. Avaliação quantitativa de mitocôndrias por quantificação de DLoop..	46
Figura 15. O padrão de crescimento das células tumorais Tm5 foi alterado pela transfecção com ASO (Figura 4)..	48
Figura 16. A avaliação da sobrevivência celular foi novamente realizada utilizando o critério de exclusão por azul de Tripan.....	49

Figura 17. Crescimento tumoral in vivo nos grupos LIPO+ASO e LIPO+SO.....	51
Figura 18. Diferenças entre as áreas de necrose apresentadas entre os grupos tratado (ASO) e controle (SO).....	53
Figura 19. Micrografias representativas dos tumores controle (SO) (A) e tratados (ASO) (B) após coloração por HE.....	54
Figura 20. Imuno-histoquímica contra PGC-1 β em lâminas de melanoma e nevus humanos.....	56
Figura 21. Gráfico quantitativo das marcações por Imuno-histoquímica trazida nos painéis A e B da figura 20.	57
Figura 22. Gráfico representa a quantificação dos níveis de RNAm do co-ativador após transfecção de plasmídeos bacterianos implantados com sequências de shRNA contra PGC-1 β ..	59
Tabela 1. Primers e protocolos utilizados para Real Time PCR.....	25
Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para silenciamento de PGC-1 β ...	27

Resumo

PGC-1 β é um co-ativador de transcrição gênica responsável pela regulação do metabolismo celular, principalmente na biogênese e função mitocondrial, disponibilidade de substrato e síntese de lipídios. Nos últimos anos, outras isoformas de PGC-1 têm sido descritos como participantes na gênese e manutenção de tumores. Portanto, nosso objetivo foi determinar se o PGC-1 β está relacionado ao aumento da proliferação celular de células de melanoma.

Inicialmente, foi demonstrado que os níveis de RNAm e proteína de PGC-1 β são muito mais elevados em linhagens de células de melanoma (Tm1 e Tm5) do que na linhagem parental de melanócitos não tumorais (Melan-a) como detectado por PCR quantitativa e western blotting. A fim de descobrir uma relação causal entre a expressão de PGC-1 β e crescimento celular da linhagem Tm5, células de tal linhagem foram transfectadas com um oligonucleotídeo antisense (ASO) contra PGC-1 β . As células tratados com ASO apresentaram níveis mais baixos de RNAm e proteína PGC-1 β , além de redução em sua atividade avaliada pela expressão de genes PGC-1 β dependentes. Além disso, as células transfectadas apresentaram uma taxa de proliferação inferior em comparação com células de controle Tm5. Este fenômeno também foi observado *in vivo*. Quando injetadas em camundongos, as células Tm5 desenvolvem-se em um tumor que atinge $1,34 \pm 0,20$ cm³ após nove dias. Tumores tratados com ASO após o mesmo tempo apresentaram volume tumoral de $0,75 \pm 0,05$ cm³. Este crescimento não estava relacionada à necrose tumoral, mas sim com a proliferação reduzida de células. Finalmente, verificamos se o mesmo fenômeno seria observado em humanos. A expressão PGC-1 β foi muito maior em amostras de melanoma do que em nevos, alterações não-malignas da pele com alto conteúdo de melanina.

Por conseguinte, conclui-se que a expressão PGC-1 β está aumentada no melanoma, tanto murino e humano, e que o bloqueio da sua atividade leva à diminuição da proliferação celular e crescimento tumoral.

Descritores: PGC-1, melanoma, proliferação de células, neoplasias cutâneas

Abstract

PGC-1 β is a co-activator of gene transcription primarily responsible for the regulation of cellular metabolism, mainly in mitochondrial biogenesis and function and also substrate and lipid synthesis. In recent years, other isoforms of PGC-1 have been described as participating in the genesis and maintenance of tumors. Therefore, our objective was to determine whether PGC-1 β is related to increased proliferation of melanoma cells.

Initially, it was demonstrated that mRNA and protein levels of PGC-1 β are much higher in melanoma cell lines (Tm1 and TM5) than in the non-tumoral parental lineage melanocytes (melan-a) as detected by quantitative PCR and Western blotting. In order to find a causal relationship between the expression of PGC-1 β and cell growth, Tm5 lineage cells were transfected with an antisense oligonucleotide (ASO) against PGC-1 β . The cells treated with ASO had lower levels of PGC-1 β mRNA and protein, as well as reduction in its activity detected by quantitation of PGC-1 β dependent genes expression. Furthermore, transfected cells showed a lower rate of proliferation compared to Tm5control cells. This phenomenon was also observed in vivo. When injected into mice, Tm5 cells develop a tumor which reaches $1.34 \pm 0.20 \text{ cm}^3$ after nine days. Tumors treated with ASO, after the same time, presented tumor volume of $0.75 \pm 0.05 \text{ cm}^3$. This growth was not related to tumor necrosis, but with reduced cell proliferation. Finally, we checked whether the same phenomenon would be observed in humans. The PGC-1 β expression was much higher in melanoma samples than in nevi, a non-malignant skin alteration filled with melanin.

Therefore, we concluded that PGC-1 β expression in melanoma is increased, both in murine and human, and that blocking its activity leads to decreased cell proliferation and tumor growth.

Descriptors: PGC-1, melanoma, cell proliferation, cutaneous neoplasias

1. Introdução

1.1. Melanoma enquanto alvo de pesquisa

Em menos de uma década, contínuas descobertas modificaram significativamente conceitos sobre o câncer; por exemplo, passa-se a entendê-lo, em termos genéricos, como um complexo tecido, composto por diferentes tipos celulares se relacionando dentro de um microambiente, ao invés de simplesmente enxergá-lo como uma massa de células proliferativas (Hanahan e Weinberg, 2011).

Tais avanços determinaram proposições de tratamentos cujo sucesso tem acompanhado o índice de ocorrência da doença na atualidade. Contudo, este cenário não pode ser entendido como verdade absoluta para diversos casos, estando entre eles o melanoma.

A despeito de sua incidência de apenas 5% quando comparado a outras formas de câncer de pele, aproximadamente 80% dos prognósticos negativos e mortes são diretamente relacionados ao melanoma (Bertolloto, 2013). Outros estudos ainda demonstram haver tendência de crescimento no referido índice de ocorrência, assim como na taxa de mortalidade em decorrência da doença (fig. 1), considerando principalmente a influência de fatores de risco de ordem genética, fenotípica ou socioambiental – compreendendo regulação hormonal, exposição à luz UV natural e artificial, podendo se estender à ocupação profissional e hábitos sociais (Hauschild e Eggermont, 2009).

Dois pontos ainda se mostram de relevância para análise dos índices de incidência e mortalidade do melanoma, a saber: falta de diagnóstico e baixa resposta às terapias tradicionais (Lens e Dawers, 2004).

Quando descoberto em estágios iniciais, pacientes com melanoma apresentam índice de sobrevivência de 90% a 100% em até cinco anos após o diagnóstico inicial, uma vez que em tais casos pode-se recorrer à excisão cirúrgica do tumor (Slipicevic e Herlyn, 2012). A questão que ergue a barreira para o tratamento cirúrgico em quadros iniciais se encontra nos recursos imprecisos e escassos para garantir um diagnóstico inicial efetivo.

Figura 1 – Incidência e Mortalidade em função de melanoma maligno entre 1975 e 2005 padronizado por idade. Adaptado de Hauschild e Eggermont (2009).

Atualmente existem duas formas de diagnosticar o melanoma. A primeira delas se trata do simples exame visual dermatológico, no qual o paciente sob suspeita é examinado sob o olho nu do dermatologista; a segunda forma de diagnóstico é a dermoscopia não invasiva, na qual a área de pele suspeita é submetida à técnicas de iluminação para detalhamento da morfologia e posterior análise do resultado pelo perito (Masood e Al-Jumaily, 2013), sendo que independentemente da técnica, o resultado final fica sujeito à análise subjetiva do médico, ainda que sistemas de algoritmos sejam utilizados como índices de pontuação para definição do resultado final.

Na realidade, a referida publicação demonstra ainda que é necessária experiência na área para propor o resultado do diagnóstico de modo confiável, sendo que existe uma redução de 30% na acuidade do resultado quando a mesma amostra é analisada por médicos menos familiarizados, ainda que embasados pelos sistemas de algoritmo.

Tais sistemas utilizam uma classificação padrão para o nível de evolução do melanoma, abrangendo do 0 – melanoma *in situ* (região epidérmica) – ao nível IV, no qual ocorre metástase do tumor inicial e consequente formação de tumores secundários, em especial no fígado e linfonodos. Ao atingir os estágios III e IV, se avança para o segundo momento de barreira: baixa ou ausência de resposta à tratamentos tradicionais.

A pesquisa envolvendo terapias alternativas para o tratamento de melanoma metastático tem sido alvo de esforços incessantes, ainda que com baixo nível de sucesso (Gray-Schopfer e col., 2007). Em tais estágios, os tratamentos mais utilizados envolvem quimioterapia com decarbazina (DTIC) e citocinas IL-2 e IFNa2b, com sobrevida máxima de 10% dos pacientes em até um ano após o início do tratamento (Slipicevic e Herlyn, 2012).

Focando nas alterações gênicas de melanócitos, foi demonstrado que uma mutação no gene BRAF^{V600} é um importante iniciador – ainda que não completamente responsável – da transformação maligna, levando ao surgimento do melanoma (Slipicevic e Herlyn, 2012, Hauschild e Eggermont, 2009). Este dado se mostrou relevante para busca de novas drogas e terapias quando em estágio metastático, sendo uma das tentativas melhores sucedidas, resultante da inibição de BRAF por Dabrafenib associada à inibição de MPAK quinase (MEK) por Trametinib (Flaherty e col., 2012). Tratamentos isolados para inibição de BRAF demonstraram ineficiência uma vez que há reativação da cadeia de sinalização por MAPK, levando à nova ativação de BRAF. O tratamento inibitório combinado apresentou aumento da taxa de sobrevivência sem progressão da doença de 5 para 9 meses, contudo, em até um ano após o iniciada a terapia, apenas 41% dos pacientes sobreviveram.

Estes dados atuam como reforço da necessidade de continuar a busca por novos caminhos de sinalização que possam atuar como alvos terapêuticos, destacando o papel do melanoma enquanto objeto e interesse de pesquisa.

1.2. Alterações metabólicas no câncer

Evidenciada a necessidade de buscar caminhos alternativos e novas abordagens de pesquisa no tangente à progressão do câncer, um dos achados científicos que mais ganha destaque na atualidade diz respeito a alterações metabólicas em células tumorais.

Um dos primeiros relatos, o qual recebe destaque até os dias atuais, é a descrição do efeito Warburg; este fenômeno descreve o redirecionamento das vias metabólicas em células tumorais, sendo a via glicolítica a principal fonte energética ao invés da tradicional fosforilação oxidativa, ainda que em presença de oxigênio, a despeito do menor rendimento energético resultante da alteração (Vander Heiden e col., 2009). Algumas teorias apontam ser o menor nível de produção energética compensado pela possível facilitação da proliferação, uma vez que os produtos resultantes da via glicolítica poderiam ser utilizados

como substrato para biossíntese de componentes necessários para formação de novas células, de tal modo que a reprogramação da via metabólica poderia ser considerada uma característica inerente ao câncer (Hanahan e Weinberg, 2011).

Outro efeito resultante da descrição do efeito Warburg foi a negligência do papel mitocondrial no câncer, o qual tem sido retomado por novos estudos durante a última década, levantando o fato da respiração mitocondrial poder ser relacionada com a capacidade proliferativa em diversas vias de sinalização (Fritz e Fajas, 2010).

Uma das vias que melhor tem sido estudada é a sinalização REDOX. Esta via é dependente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) decorrentes da fosforilação oxidativa principalmente. Uma das vias mediada por ROS é a regulação de p53, a qual já foi relacionada à ativação de apoptose (Gottlieb e col., 2009) em células tumorais; contudo, descreveu-se que a p53 sob presença contínua de ROS passa a atuar como mecanismo de reparo ao stress oxidativo, implicando no aumento da resistência e sobrevivência celular (Ralph e col., 2010).

Em outra publicação recente foi estabelecido que a decisão celular acerca de estimular o processo de divisão pode ser influenciado por enzimas metabólicas, a exemplo da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bisfosfatase isoenzima 3 (PFKFB3), piruvato quinase (PK) e ácido graxo-sintase (FAS), além de pequenas moléculas derivadas de metabolismo como glicose e frutose-2,6-bisfosfato (Buchakijan e Kornbluth, 2010). Estas substâncias apresentaram capacidade de influenciar a ativação de ciclinas B, de modo a promover a alteração das diferentes passagens do ciclo celular, por exemplo, de M para G1, assim como podem fazê-lo com as ciclinas do tipo D, promovendo a mudança de G1 para S. Um fato curioso está na capacidade de tais vias, em especial a ativação de ciclinas D por PK e FAS, serem também estimuladas pela captação de glicose, a qual pode ser aumentada pela síntese de canais transportadores GLUT, estimulados em função do efeito Warburg, permitindo avaliar a existências de tumores que se utilizem tanto da via glicolítica quanto da via metabólica clássica para garantir sobrevivência e capacidade proliferativa (Weinber e col., 2010).

Pensando no modelo de melanoma em relação à abordagem metabólica, também se descreveu recentemente haver aumento da OXPHOS de células tumorais quando comparadas à células normais de epiderme (Moura e col., 2012). Neste trabalho os autores demonstraram que o tratamento com droga bloqueadora de respiração mitocondrial, reduzindo a produção de ATP e o consumo de oxigênio (indicadores de fosforilação

oxidativa) sem que haja alteração da produção de lactato (indicador de via glicolítica), é capaz de levar à morte celular, o que significa dizer que em células tumorais de melanoma não há aplicação direta do efeito Warburg, implicando na adoção efetiva da mitocôndria e vias de sinalização por ela mediada como alvo de pesquisa para o melanoma.

De modo singular, o que chama a atenção ao tratar de tais vias metabólicas, cruciais para a proliferação, é o fato das mesmas serem influenciadas pela ação de PGC-1 (PPAR γ co-activator 1) (Summermatter e col., 2010).

1.3. O co-ativador de transcrição PGC-1

A proteína PGC-1 foi descrita inicialmente como fator responsável pela termogênese adaptativa em tecido adiposo marrom, sendo ativado pela exposição ao frio (Puigserver e col., 1997); nesta descrição inicial, sua função majoritária seria a ativação da transcrição mediada pelo fator PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated-Receptor γ) (Puigserver e col. 1998).

Apesar da descrição realizada pelos autores inicialmente se focar na descrição de um novo fator relacionado à ação de PPAR γ , outro termo foi adicionado ao vocabulário científico na referida publicação: proteína co-ativadora de transcrição. Neste sentido se passou a definir co-ativadores de transcrição como proteínas, ou complexo das mesmas, capazes de interagir com fatores de transcrição de modo a ativar ou reprimir a transcrição de genes específicos, sem que se liguem fisicamente ao DNA (Glass e Rosenfeld 2000; Liang e Ward 2006). Esta definição da atividade desempenhada pela proteína PGC-1 motivou diferentes estudos a seu respeito, tendo ela posteriormente se mostrado como um co-ativador de amplo espectro de ligações e vias de sinalização, capaz de se ligar a diversos outros fatores de transcrição, a exemplo do Forkhead Box O1 e Receptor Relacionado ao Estrógeno α (ERR α), além de outro membro da família PPAR: a isoforma α do fator de transcrição (Handschin e Spiegelman, 2006).

Estudos subsequentes buscaram detalhar a estrutura do PGC-1, descrevendo uma molécula complexa, de localização predominantemente na região nuclear, possuindo 798 aminoácidos (aa), com uma região de ligação ao RNA entre os aa 677 e 709, além de possuir duas regiões ricas em serina (domínios SR) cuja interação se dá com o domínio C-terminal da RNA polimerase II (Puigserver e Spiegelman, 2003; Liang and Ward 2006). Em função de manter a ligação com a polimerase, observou-se que o co-ativador não

demonstra somente função de coordenação de transcrição, mas também o relaciona com a maquinaria de splicing do RNA mensageiro (mRNA); a interferência do co-ativador também nesta etapa do processo de transcrição poderia prover uma possível explicação para a estimulação de diferentes vias através somente de apenas um fator de transcrição, como exemplificado pelas múltiplas funções exercidas pelo PPAR γ (Knutti e Kralli, 2001).

Sabe-se ainda que o PGC-1 está relacionado com a síntese de seu próprio mRNA, atuando também como molécula auto regulatória, o que significa dizer que mantido o estímulo inicial, haverá também a adição do estímulo próprio, mantendo o ciclo responsivo ao estímulo externo; ocorre ainda participação no processo de splicing de seu próprio RNA, sendo que a partir de nova síntese se permite a criação de variantes da molécula, as quais apresentem afinidades por fatores de transcrição diferentes, culminando no processo de especificidade de ligação conforme splicing, gerando a gama de ligantes possíveis para o PGC-1 em função de diferentes estimulações, como trazido na figura 2 (Handschin e Spiegelman, 2006). Ainda neste sentido, também se caracterizou o domínio LXXLL entre os aa 142 e 146, cuja função seria mediar a interação entre o co-ativador e os receptores nucleares, sendo, portanto, alvo desta maquinaria de splicing (Puigserver, 1998).

Figura 2. Regulação da transcrição de PGC-1 α em função de estímulos tecido-específicos. Notar a capacidade auto regulatória exibida pelo co-ativador. Adaptado de Handschin e Spiegelman, 2006.

Para definir o mecanismo de ação do co-ativador no tangente à estimulação da transcrição especificamente, foram caracterizadas na porção C-terminal de sua molécula regiões de ligação com complexos mediadores, a exemplo da Proteína Associada com Receptor de Tireóide (TRAP) e Proteína de Interação com Receptor de Vitamina D (DRIP) (Handschin and Spiegelman 2006; Knutti e Kralli, 2006). A função primordial de tais ligações seria a de alterar a estrutura física do co-ativador, realizando a abertura da molécula de modo a exibir os sítios de ligação com fatores de transcrição e com a RNA polimerase. Uma vez aberto, exibe-se na porção N-terminal no co-ativador sítios de interação com fatores que possuem atividade HAT (histona acetil-transferase) – implicando na acetilação de histonas e consequente desdobramento do DNA para a transcrição; entre estes fatores estão principalmente o CBP/p300 e o SRC-1 e tal ligação é essencial para a funcionalidade do co-ativador, considerando que ele próprio não possua atividade HAT. (Finck e Kelly, 2006).

Logo após sua descrição inicial, demonstrou-se não haver somente uma variação do co-ativador, mas sim três isoformas distintas, levando à caracterização da família PGC-1 e sua composição por PGC-1 α , PGC-1 β e PRC (PGC-1 related coactivator,). Os três membros apresentam alto nível de homologia e conservação entre si e entre diferentes espécies, principalmente no tangente aos sítios de ligação, ainda que sua distribuição seja diferente em relação a tecidos, havendo também diferenciação discreta de funções descritas – mesmo que se note ampla redundância entre os papéis dos três membros (Handschin e Spiegelman, 2006). A estrutura e o mecanismo de ação esquemáticos estão dispostos na figura 3.

Dentre os três membros, a molécula melhor descrita e estudada é o PGC-1 α (Savagner e col., 2003), cuja distribuição principal ocorre em tecidos com alto nível de metabolismo oxidativo e abundância de mitocôndrias, como tecido adiposo marrom, coração e músculo estriado esquelético (Knutti e Kralli, 2006; Finck e Kelly, 2006). Dada a distribuição do co-ativador, sua atividade geral foi logo associada à atividade mitocondrial (Liang e Ward, 2006; Lin e col., 2003) sugerindo haver íntima relação de sua expressão com a manutenção da homeostase energética, ressaltando o aumento da biogênese mitocondrial e indução de enzimas atuantes na OXPHOS (Savagner e col., 2003; Knutti e Kralli, 2006).

Figura 3. Ação e estrutura dos co-ativadores PGC-1. A – mecanismo esquemático de ação do co-ativador no processo de transcrição gênico. B – estrutura simplificada das moléculas componentes da família de co-ativadores. Notar a conservação dos domínios entre as isoformas. Adaptado de Rowe e col., 2010.

A biogênese mitocondrial é um processo complexo e ainda que completamente não caracterizado, Gleyzer e col. (2005) a descrevem sendo uma cascata de sinalização mediada por diversos fatores de transcrição, sendo que uma das maiores lacunas desta via pairava no aspecto de ativação destes fatores. Entre os principais alvos nucleares iniciadores da cadeia encontram-se os Fatores Respiratórios Nucleares (NRF) 1 e 2, assim como o ERR α .

Sabe-se que a sinalização se inicia com a própria estimulação à transcrição do co-ativador mediada por TORC1, através da ativação de CREB (Wu et al., 2006); uma vez transcrito, o co-ativador é responsável pela sinalização para transcrição de NRF-1, sendo o fator nuclear resultante novamente co-ativado por PGC-1 – de modo que se observa não somente a estimulação da transcrição inicial, mas também envolvimento efetivo no processo – cabendo ressaltar que neste caso também se nota a co-ativação de ERR α ,

levando à produção de NRF-2, cuja função efetiva ainda não é completamente conhecida, contudo já foi demonstrado a existência de um *loop* de estimulação mediado por NRF-2, mantendo a transcrição destes níveis de NRF-1 (Mirebeau-Prunier e col., 2010).

Uma vez que haja ligação entre NRF-1 e PGC-1 observa-se a produção de RNAm para o Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM, alternativamente nomeado mtTFA), o qual é deslocado para o complexo de mitocôndrias da célula onde vai estimular a biogênese através da estimulação do próprio DNA mitocondrial por ligação ao DLoop, sendo responsável também pela ativação do citocromo c (Vercauteren e col., 2006), de modo que podemos inferir ser a sinalização mediada por PGC-1 responsável também pela estimulação e manutenção da atividade mitocondrial, além da biogênese em si.

A despeito de ser uma das vias melhores descritas e de maior impacto na sinalização do co-ativador, ainda se demonstra que ela não é única, podendo ser diferenciada em função do estímulo e do tecido afetado por tal estímulo, a exemplo da própria termogênese adaptativa em BAT em resposta ao frio – cuja caracterização levou à descoberta do PGC-1, conforme mencionado anteriormente.

Tratando inicialmente dos sinais que podem levar à estimulação ou repressão da atividade dos co-ativadores foram relatados, além da exposição ao frio, exercício e jejum (Handschin e Spiegelman, 2006); acúmulo de triglicerídeos hepáticos e desequilíbrios hormonais (principalmente hormônios de tireóide) (Estakk e col., 2009; Attia e col., 2010); alterações da sinalização REDOX (Gleyzer e Scarpulla, 2011) e alterações na concentração de glicose intracelular (Puigserver e col., 2001).

Quanto às funções do co-ativador de modo tecido-dependente, observa-se diferenças entre as ações das isoformas α e β . No fígado observa-se que a isoforma α é responsável pela estimulação à gliconeogênese em resposta ao jejum, ao passo que a isoforma β aumenta a lipogênese e o transporte de lipoproteínas sem que haja relação com a estimulação feita à outra isoforma (Estall e col., 2009). Ainda no fígado, a isoforma β pode estimular a captação de glicose em função dos níveis detectáveis de insulina, em contrapartida, em fibras musculares tal captação de glicose fica sujeita à ação da isoforma α quando em exercício. Também no músculo observou-se que a sinalização por AMPc induz a diferenciação de fibras musculares tipo I e IIa mediada por PGC-1 α , assim como esta mesma sinalização induz a transformação de células adiposas do tecido marrom em tecido branco (Uldry e col., 2006). Ainda considerando o tecido adiposo marrom, temos também a já referida termogênese adaptativa, também mediada por PGC-1 α .

Em tecido cardíaco foi demonstrado que, também sob estímulo adrenérgico e AMPc, o PGC-1 α pode levar à diferenciação dos miocárdios e estimulação à angiogênese, além do já citado processo de biogênese mitocondrial. Neste mesmo tecido também foi demonstrado que a isoforma β atua de modo a expandir o aporte energético através da importação de lipídeos e aumento da respiração celular (Rowe e col., 2010).

Além disso, a isoforma β também foi implicada com a ativação e função do sistema imune através da estimulação de macrófagos derivados de medula óssea através da ativação de IFN- γ , sem que o mesmo fenômeno fosse associado à isoforma α (Giguère, 2008). De modo similar, a isoforma β também foi associada à progressão no ciclo celular e proliferação através da estimulação indireta de ciclinas pela enzima FAS (Buchakjian e Kornbluth, 2010) assim como pela co-ativação de HCF-1 (Lin e col., 2002).

Pouco ainda se sabe sobre ações específicas do PRC, além do fato de ser o único membro expresso de modo ubíquo e também estar relacionado ao controle indireto do ciclo celular (Vercauteren e col., 2006).

Buscando ainda evidenciar diferentes funções e mecanismos envolvendo os membros da família de co-ativadores, foram descritos mecanismos de regulação da atividade destes. O primeiro ponto observado traz como ressalva sua relação com a p38 MAPK, sendo esta responsável pela fosforilação do PGC-1, aumentando a meia-vida do co-ativador de 15-20 minutos para tempos próximos de três horas, garantindo maior viabilidade da proteína (Puigserver e Spiegelman, 2003). Também se notou que PGC-1 α apresenta suscetibilidade à maior gama de agentes regulatórios do que a isoforma β ; os níveis de glicose intracelular foram descritos como via inicial de controle da atividade desta primeira isoforma descrita, observando que níveis elevados de concentração da molécula induzem acetilação de PGC-1 α por O-GlcNac Transferase, ao passo que a desacetilação é mediada por SIRT1 quando em baixas concentrações de glicose (Kelly e col, 2009). Também se relatou na referida publicação que a isoforma α pode ser metilada ou ubiquitinada por PRMT1 e SCF (Cdc4) respectivamente. Contudo, a despeito da desacetilação por SIRT1, pouco se sabe sobre formas de controle de redução de expressão e atividade do PGC-1 α , indicando maior tendência à estímulo à sua função (Rowe e col., 2010).

Em contrapartida, ainda que não completamente exploradas, as vias de regulação de PGC-1 β se mostram menos variáveis do que o observado para isoforma α . Sabe-se que a estimulação ocorre por acetilação nos resíduos de lisina por GCN5 e a desacetilação

também é mediada por SIRT1, cabendo ressaltar que somente esta via é suficiente para garantir a funcionalidade do co-ativador, implicando que sua desregulação poderia levar à desordens metabólicas (Kelly e col., 2009). Ambas as isoformas estão sujeitas ao controle por estimulação β -adrenérgica frente a estímulos externos, utilizando como sinalizador intracelular o AMPc (Yoon e col., 2001). Pouco se sabe sobre as formas de regulação do PRC, contudo, por apresentar conservação dos domínios LXXLL acredita-se que ele também esteja sujeito aos mecanismos de controle descritos para os demais membros (Gleyzer e Scarpulla, 2011).

Notavelmente, as descobertas acerca do PGC-1 e sua gama de ligantes e funções representaram um novo ponto de partida para questões de interesse na pesquisa, permitindo que o co-ativador fosse ligado, inicialmente, ao estudo de várias desordens metabólicas e novas abordagens terapêuticas. Tais pesquisas também foram aplicadas à diversos outros cenários e distúrbios, expandindo a influência e importância do co-ativador enquanto alvo de pesquisa.

1.4. Distúrbios derivados de alterações na expressão de PGC-1

Atuando como orquestrador da homeostase energética celular e mediador de diversas vias de sinalização metabólica, faz-se lógico pensar na atividade e expressão dos co-ativadores da família PGC-1 enquanto pivôs da instauração e/ou progressão de distúrbios de ordem metabólica, sendo esta relação alvo de pesquisas extensivas durante a última década.

Trabalhos iniciais realizados em camundongos descrevem relação direta entre níveis reduzidos de insulina, ou resistência ao hormônio, apresentado pelos animais com o aumento da expressão de PGC-1 α e o quadro observado (Yoon e col., 2001). Foi demonstrado que tais alterações induzem a gliconeogênese hepática mediada pelo co-ativador, como mecanismo compensatório à baixa captação de glicose. Em células musculares sob a estimulação de exercício e baixos níveis de glicose, o PGC-1 α estimula a formação de canais GLUT4, aumentando a captação de glicose ao invés de estimular sua formação *de novo* (Michael e col., 2001).

Ainda utilizando o modelo hepático, também foi demonstrado que camundongos submetidos ao jejum prolongado apresentam reprogramação das vias gliconeogênica e de oxidação de ácidos graxos, sendo que a indução experimental de PGC-1 α através de vetor

viral em camundongos sob tal situação apresentou elevações da concentração de glicose comparáveis a quadros iniciais de diabetes (Rhee e col., 2003).

Quando trazidos a um ponto comum, fica claro que os trabalhos anteriores utilizaram a alta concentração de glicose enquanto parâmetro, buscando estabelecer um fundamento de correlação entre a expressão gênica do co-ativador e o efetivo quadro de diabetes. Esta relação logo tomou forma efetiva. Foi demonstrado que em casos clinicamente diagnosticados como diabetes tipo 2 há uma redução efetiva na expressão de genes relacionados à fosforilação oxidativa e função mitocondrial (Lowell e Shulman, 2005). Sabidamente estes genes são alvos primários das isoformas α e β do co-ativador e estudos subsequentes confirmaram haver redução da expressão dos co-ativadores em quadros de diabetes tipo 2 (Handschin e Spiegelman, 2006), demonstrando ainda que a expressão do co-ativador também é idade-dependente, tendendo a reduzir em função do tempo, o que implica em maior susceptibilidade à doença em idade avançada.

Além disto, o PGC-1 também foi apontado como mediador da ativação de enzimas do complexo PDC – tais enzimas são responsáveis pela descarboxilação do piruvato, levando à formação de AcetilCoA – de tal modo que a redução dos níveis do co-ativador leva à utilização precária de glicose e energia, apresentando uma resposta errônea ao mecanismo de *feedback* tireodiano, uma vez que o hormônio T_3 é iniciador desta via de sinalização, tendo como consequência o acúmulo de glicose não utilizada em tecido adiposo e no fígado (Attia e col., 2009).

Alterações na atividade do co-ativador também foram relacionadas a alterações no desenvolvimento e no funcionamento do coração. Este órgão apresenta uma das maiores necessidades de aporte energético, sendo que falhas no sistema mitocondrial são associadas à 50% dos casos de cardiomiopatia em humanos, sendo que o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em modelo de camundongo também levou à detecção de níveis reduzidos do co-ativador (Rowe e col., 2010). Trabalhos feitos utilizando camundongos KO para PGC-1 α também demonstraram menor resistência ao exercício e débito cardíaco, indicando falhas na fisiologia do órgão, as quais foram associadas à resposta nula para sinalização de genes da OXPHOS (Arany e col., 2005). Ainda como fator resultante do abalo da expressão de PGC-1 α também se notou haver conversão do substrato energético, sendo a glicose utilizada no lugar dos ácidos graxos, obtendo como resultado menor aporte energético primário, o que poderia ser uma das razões levando à falta de resposta do músculo sob exercício (Handschin e Spiegelman, 2006).

Com a criação de camundongos deficientes para o co-ativador, além das pesquisas relacionadas ao funcionamento cardíaco também foram observadas alterações no desenvolvimento e funcionamento do cérebro; relatou-se que nestes camundongos há aumento da susceptibilidade a drogas de ação neurotóxica, possivelmente em função da perda de proteção à ROS, papel também desempenhado por PGC-1 através da ativação de SOD2 (St-Pierre e col., 2006). Implicações no movimento e reflexos também foram observadas de modo concomitante com níveis reduzidos de PGC-1 α , impactando severamente em hiperatividade associadas a degenerações na região do núcleo estriado, também associadas à efeitos colaterais da regulação falha de ROS (Lin e col., 2005). Sabe-se que a hiperatividade nestes camundongos implica em falha ao utilizar fibras musculares do tipo IIa, cujo metabolismo é essencialmente oxidativo, sendo possível observar manutenção das fibras do tipo IIb – com metabolismo glicolítico – quando há redução nos níveis de PGC-1 α , também corroborando com respostas lentas à estímulos musculares, ainda que seja observado constante estado de exercício (Arany e col., 2005).

As lesões observadas em camundongos *pgc-1 α -/-* na região do núcleo estriado são semelhantes às aquelas apresentadas por indivíduos portadores da Doença de Huntington, patologia marcada por alterações na capacidade movimento, fato este que também permitiu relacionar a expressão da proteína com outras doenças de caráter neurodegenerativo, a princípio com o Mal de Parkinson, também marcado por perda da capacidade de controle fino do movimento, sendo posteriormente também ligado ao Mal de Alzheimer, uma vez que o cérebro de camundongos KO também apresentaram lesões cerebrais marcadamente características desta doenças: Hipocampo e Substância Nígra, respectivamente (Handschin e Spiegelman, 2006).

Trabalhos mais recentes também identificaram a participação do PGC-1 em doença de caráter inflamatório, sendo a aterosclerose um dos principais alvos de pesquisa. A aterosclerose é marcada pela redução da capacidade de dilatação do endotélio, sendo uma doença inflamatória crônica cuja oxidação proteica por ROS é um dos fatores de risco melhores descritos, de tal modo que a atividade do co-ativador se associa ao aumento de probabilidade de seu desenvolvimento. Contudo, também se demonstrou que a fissão ou fusão de mitocôndrias é um evento mediado por PGC-1 α , de tal modo que tal alteração na estrutura celular também poderia levar à morte de células endoteliais ou musculares lisas, também favorecendo a formação da placa aterosclerótica (Chang e col., 2010).

As atividades de PGC-1 β e de PRC também foram relacionadas de modo mais direto ao controle da diferenciação de macrófagos e estimulação da transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório. Em resposta ao stress induzido alteração na sinalização REDOX ou deprivação de substrato energético, demonstrou-se que o PRC atua como iniciador da resposta inflamatória, incentivando a transcrição de genes NRF-1-dependentes (Gleyzer e Scarpulla, 2011). A isoforma β do co-ativador se mostrou responsável por estimular a migração e a diferenciação de macrófagos da medula óssea através de associação com HCF (Lin e col., 2001). Em ambos os casos se notou que a redução experimental das proteínas leva à quadros de resposta nula ou falha da resposta inflamatória.

Entretanto, duas publicações apontam também outros aspectos da expressão de PGC-1 β especificamente. Nestes trabalhos observou-se que o co-ativador também se mostrou capaz de estimular a secreção de insulina, através da ativação de SREBP, quando há aumento na concentração de glicose, auxiliando a captação e protegendo contra quadros de hiperglicemia (Oberklofer e col., 2009), sendo que a mesma via de sinalização atua como mecanismo de controle da hiperlipidemia estimulando o metabolismo de ácidos graxos, reduzindo a circulação de ácidos graxos e aumentando os níveis de VLDL circulantes (Lin e col., 2005).

Frente a todas as implicações e distúrbios exercidos por alterações na sinalização do co-ativador em relação ao controle metabólico e considerando o panorama exposto anteriormente sobre este aspecto no câncer, faz-se lógico pensar também no papel exercido pela família PGC-1 nesta doença especificamente.

1.5. PGC-1 e Câncer

A literatura explorando a relação entre a atividade dos co-ativadores da família PGC-1 e o câncer apresentou crescimento expressivo na última década, explorando aspectos relacionados a diagnóstico, progressão e mortalidade da doença.

Os dados obtidos com as pesquisas iniciais apontaram vários momentos de controvérsia em relação às conclusões obtidas, permitindo que dois cenários iniciais fossem esquematizados.

No primeiro momento, os dados apontaram os efeitos exibidos pela baixa expressão de PGC-1, utilizando como modelo experimental linhagens celulares de câncer de mama não invasivas – MCF-7 – e invasivas – TNM3 e TNM4 – sendo este o primeiro trabalho a relacionar o co-ativador com a sobrevida dos pacientes (Jiang e col., 2003). Na linhagem MCF-7 não foram observadas diferenças significativas, porém ao tratar de linhagens invasivas e metastáticas, os níveis de PGC-1 se apresentam reduzidos, assim como os níveis de $\text{PPAR}\gamma$, cuja atividade se mostra dependente da ligação com o co-ativador. Sabe-se que um dos aspectos regulados por $\text{PPAR}\gamma$, a expressão de E-caderina, foi relacionado com a supressão tumoral, sendo que a abaixa atividade do fator implicaria em resposta reduzida a tratamentos exógenos que visassem controle da progressão da doença. Importante pontuar que o referido estudo se utilizou de amostras obtidas de pacientes, comparando-as com as linhagens imortalizadas, observando que pacientes com menor sobrevida ou que apresentaram metástase do tumor inicial e vieram a falecer, demonstraram o mesmo padrão de expressão gênica de PGC-1 obtido em linhagens invasivas.

Observa-se em tal publicação que a redução de PGC-1 implica na baixa atividade de $\text{PPAR}\gamma$, reduzindo a resposta do tumor frente a drogas supressoras, resultando na diminuição da sobrevida dos pacientes.

Ainda no mesmo ano relatou-se haver aumento da quantidade e função mitocondrial em câncer de tireóide, associados ao aumento da expressão de PRC (Savagner, 2003). Trata-se de um fato conhecido e marcante o aumento expressivo da quantidade mitocondrial encontradas em oncocitomas, porém pouco se investigou a respeito até a descrição dos co-ativadores PGC-1; no referido trabalho adenomas e carcinomas obtidos de pacientes clínicos apresentaram também aumento na capacidade fosforilativa relacionada à atividade do complexo IV. Observou-se haver concomitância entre estes fenômenos e o aumento na síntese de DNA mitocondrial marcada pela expressão de Dloop. Curiosamente, se observou redução da expressão de PGC-1 α em relação aos controles, indicando que o mesmo poderia não estar ligado à modulação da atividade mitocondrial uma vez que não haja estimulação termogênica.

Uma afirmação marcante de tal estudo está na hipótese inicial de que a expressão elevada de co-ativadores ligados às vias energéticas poderia atuar como um indicador inicial do desenvolvimento de oncocitomas, considerando haver aumento significativo na biogênese mitocondrial independente de sinais externos para tal (Raharijaona, 2009).

Em seguida, reforçando os dados obtidos em modelo de câncer de mama, também se observou haver redução da expressão de PGC-1 em modelo de câncer colorretal, relacionando-se à baixa atividade de PPAR γ (Feilchenfeldt e col., 2004). Tal estudo, assim como seus antecessores, se utilizou de amostras obtidas de pacientes clínicos em diferentes estágios da doença, ficando demarcado que na medida em que se observa progressão da mesma também se nota menor atividade e expressão de PPAR γ e de seu co-ativador PGC-1, implicando na já descrita resistência aos medicamentos para controle da doença. Novamente, este estudo posiciona o co-ativador como marcador da progressão da doença, descrevendo o avanço da mesma como “consequência” da perda da resposta à sinais mediados por PPAR γ .

Ainda relacionando a atividade do co-ativador com a efetividade e resposta à tratamentos externos, foi demonstrado que, em câncer de próstata, a relação entre o Com-1 e o PGC-1 impacta no efeito de supressão de crescimento induzido por Ciglitizona (Jiang e col., 2006). O Com-1 foi associado à regulação do crescimento e apoptose em células tumorais, sendo a atividade de ciglitizona dependente de sua atividade gênica, em especial na modulação da enzima FAS e de PPAR γ , fatores sabidamente dependentes de PGC-1. O referido estudo demonstrou que Com-1 também se liga ao co-ativador, atuando como passo intermediário na resposta de PPAR γ ao medicamento, de tal modo que no modelo utilizado existe redução na expressão de PGC-1 α , levando a baixos níveis de Com-1 e PPAR γ ; em consequência, a resposta ao medicamento se torna reduzida. Contudo, o trabalho não avalia o papel da ligação PGC-1 α /Com-1 na modulação do crescimento ou supressão do tumor via apoptose, ressaltando a validade de maior investigação no papel desempenhado pelo co-ativador.

A expressão reduzida de PGC-1 α também foi relacionada com o processo de migração e metástase em carcinoma hepatocelular. Novamente, a baixa atividade do co-ativador foi apontada como agente redutor da resposta à medicamentos exógenos; contudo, começa-se a desvincular sua atividade das vias de sinalização de PPAR γ , avaliando-se novas interações desempenhadas pelo co-ativador que se mostrem relevantes.

Também propondo um novo papel para PGC-1 α na progressão do câncer, temos a descrição da redução de motilidade celular em células de hepatocarcinoma (Lee e col., 2009). O estudo, feito *in vitro*, utilizou o modelo de células HepG2 e descreveu haver redução nos níveis proteicos do co-ativador, sendo que a baixa de atividade impactaria na regulação da síntese de E-caderina, proteína transmembrana associada à adesão celular,

sendo a redução nos níveis da mesma associada à metástase e progressão maligna. A indução de expressão de PGC-1 α através de transfecção adenoviral se mostrou capaz de aumentar a expressão do co-ativador, tendo como consequência o aumento da síntese de E-caderina, diminuindo a mobilidade celular e a capacidade metastática das células, além de também aumentar a atividade de PPAR γ , também aumentando a resposta à tratamento que tenham o fator de transcrição como alvo, resultando no aumento da efetividade e resposta ao medicamento.

Após ser relacionado com a expressão de E-caderina, o PGC-1 também foi associado à transformação maligna em função da regulação de adesão celular. Sabe-se que o mieloma múltiplo maligno está associado à capacidade de acúmulo de linfócitos B diferenciados na medula óssea através da ligação de VCAM-1 com o agonista VLA-4, a qual estimula a produção de citocinas, em especial a IL-6 via ativação de NF- κ B, aumentando o estímulo à permanência e crescimento dos linfócitos. Apesar de requerer maior aprofundamento, foi demonstrado que a via PGC-1 α /PPAR γ poderia modular a expressão de VCAM-1 – a proteína adesiva se mostrou responsiva aos ligantes de PPAR γ , tendo sua expressão inibida por pioglitazona – sendo que a inibição de PPAR γ reduz a capacidade inibitória de seus ligantes (Wang e col.2012). A mesma publicação ainda descreve haver dependência de NF- κ B por PGC-1, existindo uma “inibição competitiva” da atividade do co-ativador, uma vez que sua ligação com PPAR γ limitaria sua capacidade de estimular a atividade de NF- κ B, levando a redução na produção de IL-6, complementando a já reduzida expressão de VCAM-1 quando se observa aumento na atividade de PPAR γ . De modo geral, o trabalho descreve novas vias de sinalização envolvendo PGC-1, as quais possibilitariam abordagens diferenciadas ao tratamento de mieloma, porém não foca na atividade do co-ativador ou se propõe a elucidar o papel do co-ativador na progressão da doença.

As primeiras correlações estabelecidas diretamente entre a função metabólica do co-ativador e a progressão do câncer se deram com estudos em fibroblastos sequencialmente modificados com oncogenes; nestas células se observou haver aumento da expressão de PGC-1 α em concomitância com o avanço dos estágios de transformação (Girnun, 2012). Foi observado que o aumento da atividade do co-ativador levou ao aumento da atividade oxidativa, captação de glicose e elevação nos níveis de NADH e ATP, indicando aumento da função mitocondrial e produção energética. De modo sintético, se observou que a progressão da doença e aumento da malignidade se dá de modo

concomitante com aumento da atividade do co-ativador e, por consequência, do aumento da biodisponibilidade energética.

A sinalização de PGC-1 α e alterações nas vias mitocondriais também foram descritas em câncer de pele desenvolvido por pacientes após exposição a arsênico. No caso em questão foi relatado haver aumento do co-ativador, novamente alterando a biogênese mitocondrial, de tal modo que o excesso de mitocôndrias funcionais teria alterado o feedback entre tais organelas e o núcleo; o crescente número mitocondrial seria indicativo ao núcleo da manutenção do crescimento e proliferação, sinalizando necessidade de avanço no ciclo celular (Jones e col., 2012). O mesmo fenômeno também foi observado em modelo *in vitro* de câncer cervical, utilizando células HeLa, sendo observado que o aumento do número de mitocôndrias estaria alterando a captação de Ca²⁺ e o seu acúmulo na matriz mitocondrial; sabe-se que o acúmulo patológico de Ca²⁺ implica no início de sinalização apoptótica pela mitocôndria, de tal modo que a falta deste sinal implica no desenvolvimento de um mecanismo de escape às vias de controle de proliferação, também implicando na manutenção da proliferação celular e progressão da doença.

Recentemente também foi descrito um papel fundamental envolvendo a expressão de PGC-1 α na progressão de melanoma. Em linhagens A375P foi observado haver aumento da expressão do co-ativador, o qual estaria envolvido não somente na progressão do melanoma, mas também no processo melanomagênico, uma vez que o co-ativador é responsável pela ativação de MITF, oncogene relacionado ao desenvolvimento da doença. Também foi observado que o aumento da expressão de PGC-1 α poderia conferir maior resistência ao stress oxidativo, reduzindo a sensibilidade do tumor a tratamentos baseados em tal princípio (Vazquez e col., 2013), sendo ainda descrito que apenas algumas linhagens de melanoma apresentariam tal capacidade, definindo-se, portanto um subgrupo do câncer, cujo metabolismo se torna dependente da ação do co-ativador, também demonstrando a existência efetiva da capacidade de reprogramação de obtenção energética por células tumorais em função do contexto, visando a manutenção da capacidade de sobrevivência.

Ainda buscando elucidar o papel direto da sinalização de PGC-1 α na progressão tumoral, experimentos feitos com modelos de perda e ganho de sua atividade em modelos murinos de câncer de fígado e cólon demonstraram haver um importante papel do metabolismo de ácidos graxos e lipídeos mediados pelo co-ativador. De modo sintético observou-se que o aumento de PGC-1 α nos modelos adotados levou a alterações nas vias de sinalização, permitindo a formação de ácidos graxos a partir de glicose, alterando a

disponibilidade de lipídeos no meio intracelular (Bhalla e col., 2013). Sabidamente, os lipídeos estão envolvidos não somente com a formação de novas membranas celulares, mas também com a sinalização intracelular e comunicação da célula com o meio externo a partir de componentes lipídicos de proteínas transmembrana ou mesmo sob a forma de mensageiros secundários no citoplasma. As alterações metabólicas associadas ao aumento de PGC-1 α estariam aumentando os recursos necessários à proliferação celular, assim como alterando vias de sinalização responsáveis pelo controle de oncogenes, culminando no processo carcinogênico, assim como sobrevivência celular e progressão tumoral.

Cabe ressaltar que a publicação supracitada menciona a existência de cenários diversos que tratam da relação PGC-1/câncer, sendo que sua ação se torna diferenciada em função do contexto, havendo dados controversos sobre o impacto do aumento ou da redução do co-ativador, cujos resultados variam em função do tecido atingido, de tal modo que a mesma abordagem utilizada em câncer de mama não pode ser adotada em câncer de cólon, por exemplo.

No tangente à expressão de PGC-1 β , os dados literários se mostram mais restritos. Em modelo de câncer de mama foi detectado aumento da expressão de tal isoforma do co-ativador, estando este associado ao aumento da proliferação celular, sendo possível observar redução da capacidade proliferativa uma vez que se tenha realizado o silenciamento da expressão gênica do co-ativador (Jones e col., 2012). Notavelmente, a supressão da atividade de PGC-1 β se mostrou capaz de reduzir a resistência do tumor aos tratamentos tradicionais. Se faz interessante notar os diferentes processos biológicos decorrentes da expressão do co-ativador, uma vez que também em modelo de câncer de mama se demonstrou haver baixa expressão de PGC-1 α , levando a um cenário similar ao disposto em aumento de PGC-1 β .

A partir de tais trabalhos e publicações, torna-se notável a existência de uma nova tendência nas linhas de pesquisa cujo foco seja o câncer. As alterações metabólicas, e a relação das mesmas nas vias de escape e progressão da doença, ao longo da última década se mostraram de relevância para que possamos compreender o complexo mecanismo denominado câncer, sendo inegável a participação dos co-ativadores da família PGC-1 neste cenário, o que nos permite trata-lo como um possível alvo terapêutico. Contudo, os resultados obtidos decorrentes de sua ação ainda se chocam, demonstrando haver controvérsias e destacando a necessidade de estudos que busquem descrever os mecanismos específicos desempenhados pelo co-ativador em diferentes situações.

2. Hipótese

Foram descritas acima características do co-ativador PGC-1, suas funções fisiológicas e sua participação na fisiopatologia de algumas doenças humanas.

Considerando-se que o PGC-1 controla, pelo menos parcialmente, a biogênese e função mitocondrial e que esses processos celulares são fundamentais no desenvolvimento de câncer, propusemos a hipótese de que haja um aumento da expressão e atividade de PGC-1 em células tumorais, alterando a sinalização realizada pelo co-ativador, de modo a culminar na progressão da doença em função da biodisponibilidade energética, implicando no aumento da proliferação celular.

Essa hipótese mostrou-se verdadeira em alguns tipos de câncer (como o de tireóide), porém nenhum estudo mostrou relação entre a capacidade carcinogênica de células tumorais e a expressão de PGC-1, nem se existe relação causal entre os fenômenos.

Nesse trabalho, pretendemos elucidar essa questão, e, uma vez que seja confirmada tal relação, determinar se o bloqueio da expressão de PGC-1 pode induzir diminuição na proliferação das células e possível redução de tumorigênese, buscando elucidar as vias de sinalização afetadas no processo, estabelecendo uma relação efetiva da sinalização mediada por PGC-1.

3. Objetivos

3.1. Geral

Estabelecer a relação entre os membros da família PGC-1 e o crescimento de células tumorais, buscando determinar a causalidade entre os eventos.

3.2. Específicos

3.2.1. Verificar a expressão de membros da família PGC-1 em células tumorais

Estratégia: A expressão de membros da família de PGC-1 (isoformas α e β) foi determinada em células tumorais de linhagens Tm1 e Tm5 através de PCR quantitativa (“Real Time PCR”) para o mRNA e western blotting, para as proteínas.

3.2.2. Determinar a capacidade de proliferação das linhagens tumorais, estabelecendo a variação entre si, assim como na linhagem melanocítica controle.

Estratégia: Avaliar através de contagem pelo método Neubauer a curva de crescimento demonstrada pelas três linhagens sob as mesmas condições de cultura celular, demarcando o crescimento e a viabilidade celular durante a extensão do experimento.

3.2.3 Determinar se existe alguma relação causal entre a expressão de PGC-1 β e a proliferação de células tumorais.

Estratégia: A expressão de PGC-1 β foi inibida em células tumorais, através da transfecção de antissenso – sendo a isoforma alvo de transfecção selecionada após experimentos de viabilidade celular e expressão gênica. Foi determinada nessas células a capacidade de proliferação comparada às células onde a expressão de PGC-1 β não foi manipulada.

3.2.4. Determinar se existe correlação entre o crescimento tumoral *in vivo* e a expressão de PGC-1 β .

Estratégia: Células tumorais foram injetadas de modo subepidérmico em camundongos C57/Black machos, levando à formação de massas tumorais, as quais foram

tratadas por injeção direta de antissenso. A curva de crescimento tumoral foi estabelecida através de medições, comparando tumores tratados com antissenso com tumores controle.

3.2.5. Verificar a expressão de PGC-1 β em amostras de melanoma humano.

Estratégia: amostras de melanoma humano foram submetidas à Imuno-Histoquímica com anticorpos anti-PGC-1 β de modo a detectar a presença do co-ativador nas amostras de tecido, comparando com tumores benignos de pele com alto nível de melanina (nevus)

3.2.6. Avaliar o silenciamento permanente de PGC-1 β por shRNA.

Estratégia: realizou-se transfecção de shRNA em células tumorais através de vetor bacteriano, verificando a ocorrência de silenciamento gênico e produção celular de shRNA por Real Time PCR.

4. Procedimentos Metodológicos

4.1. Cultura celular

As linhagens celulares utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP – LIM 24, a cargo do Prof. Dr. Roger Chammas.

Foram utilizados melanócitos de linhagem murina Melan-a (Ma) normais, bem como as linhagens tumorais Tm1 e Tm5, derivadas de Ma. Os três tipos celulares foram mantidos em meio RPMI 1640 (Cultilab), pH 6.9 e 10% de soro fetal bovino (Gibco). Também foram adicionados ao meio de cultura 100µg/ml penicilina e 100µg/ml streptomicina, sendo a cultura mantida em atmosfera contendo 5% CO₂ a 37 °C.

Em todas as linhagens foi realizado o tratamento com 40nM acetato de forbol miristato (PMA, Sigma) ao longo do tempo de experimentação – visando manter as condições de meio.

4.2. Determinação de curvas de crescimento

Células das três linhagens experimentais foram plaqueadas individualmente em placas de 6 poços – 2 placas por linhagem – a 1×10^5 células/poço. Após 24 horas do plaqueamento inicial, e nos intervalos subsequentes de 24 horas durante 5 dias, se adotou o seguinte protocolo experimental: o meio de cultura foi retirado e mantido em tubo de ensaio, os poços lavados com PBS com posterior adição de tripsina. As células no poço foram ressuspensas em 5ml de meio de cultura e adicionadas ao meio de cultura previamente retirado; o tubo foi então submetido à centrifugação a 1200RPM durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células precipitadas foram ressuspensas em 1ml de meio de cultura. Desta suspensão de células final foi retirada uma alíquota de 25µl, a qual foram adicionados 25µl de azul de Tripán. A solução foi montada em câmara de Neubauer e submetida à microscopia óptica para contagem de células. Para cada intervalo de 24 horas foram preparados 3 poços para contagem.

Foram determinados o crescimento e a viabilidade celular através da contagem, sendo a adição do azul de Tripán critério de exclusão para identificação de células inviáveis, as quais apresentaram coloração azulada no interior.

4.3. Extração de RNA e PCR

Para a extração do RNA total, células foram plaqueadas a 1×10^5 células/poço em placas de 6 poços, sendo uma placa para cada linhagem; o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS.

A cada poço foi adicionado 1ml de TRIzol (Invitrogen), sendo mantido por 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação moderada. O poço foi raspado e a amostra armazenada em eppendorf.

A cada eppendorf foram adicionados 200 µl de clorofórmio, com posterior homogeneização e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 12000g, temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e as demais frações desprezadas.

Ao sobrenadante foram adicionados 500µl de isopropanol, com incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. O produto foi centrifugado por 10 minutos na mesma velocidade e temperatura anterior e o sobrenadante novamente desprezado. Posteriormente foi adicionado 1ml de etanol 70% (diluído em água DEPC, dietilpirocarbonato), sendo realizada nova centrifugação, durante 5 minutos, 7500g a 4°C. O álcool residual foi retirado e a amostra ressuspendida em até 50 ml água DEPC.

O RNA total extraído foi armazenado a -80°C por 24 horas antes de ser quantificado por espectrofotometria NanoDrop (Thermo Scientific) a 20ng por amostra, sendo tal volume mantido sob diluição de 98 µl de água DEPC para 2 µl do RNA extraído.

Os níveis de transcritos de PGC-1 α e β , TFAM (Fator de Transcrição Mitocondrial A), NRF-1 (Fator de Respiração Nuclear), APOC3 (Alipoproteína C3) e DLoop (DNA mitocondrial) foram determinados por Real-Time PCR (Applied Biosystems) com primers específicos (Invitrogen), conforme tabela a seguir, e o resultado foi calculado sob a razão da expressão do gene housekeeping gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e exclusivamente para DLoop em função da expressão da subunidade 18S, também determinadas por Real-Time PCR.

A reação foi realizada com 15 µl de volume total, sendo 8,7 µl de água deionizada estéril; 10 µl SuperScript® III RT/ Platinum® Taq Mix (Invitrogen); 2X Reaction Mix; 0,3 µl de cada primer (sense e antisense) a 10pmol/ml; 0,3 µl de padrão colorimétrico ROX e 5 µl de RNA a 20ng/ml em termociclador StepOne (Applied Biosystems). Todas as reações

foram acompanhadas de um controle negativo (todos os componentes da reação, exceto o RNA).

Tabela 1. Primers e protocolos utilizados para Real Time PCR

Genes	Sequências		Annealing (°C)	Ciclos
GAPDH	Sense	CGG TGC TGA GTA TGT TGT GG	57,5	31
	Antisense	CCT TCC ACA ATG CCA AAG TT		
PGC-1 α	Sense	AGC CGT GAC CAC TGA CAA CGA G	55,5	31
	Antisense	GCT GCA TGG TTC TGA GTG CTA AG		
PGC-1 β	Sense	GGC AGG TTC AAC CCC GA	57,5	31
	Antisense	CTT GCT AAC ATC ACA GAG GAT ATC TTG		
TFAM	Sense	GTG AAA CGA TCC GGA GAC AT	58	37
	Antisense	ATG GAC AGT CTC CGT TCC AG		
NRF-1	Sense	CTG CTG TGG CAA CAG GGA AG	57	35
	Antisense	GGT TGG GTT TGG AGG GTG AG		
APOC3	Sense	CCC TGA AAG GCT ACT GGA GC	53	40
	Antisense	TGG AGT TGG TTG TGC CTC AG		
Dloop	Sense	CGC ACG GAC TAC AAC CAC GAC	55	30
	Antisense	TGT GGG GGG TGT CTT TGG GG		
18s	Sense	AGG AAT TGA CGG AAG GGC AC	55	30
	Antisense	GTG CAG CCC CGG ACA TCT AAG		

4.4. Detecção da expressão proteica por Western Blotting

Células das três linhagens experimentais (Ma, Tm1 e Tm5) foram plaqueadas individualmente em placas de 100mm a 4×10^5 células/placa. Para quantificação do co-ativador PGC-1 foi realizado processo de extração nuclear de proteínas, visando especificar e concentrar o volume de proteína nas amostras.

Para a extração, o meio de cultura foi retirado e as amostras foram lavadas duas vezes com tampão HBS (Hepes 0,1M 50ml, NaCl 1M 26 ml, água autoclavada 124ml); sendo em seguida lavadas uma vez com tampão RB I (KCl 1M 20ml, MgCl₂ 0,1M 10ml, EGTA 0,5M 2ml, PMSF 0,5M 500 μ l, PIC 1M 40 μ l, pirofosfato 0,1M 10ml, água autoclavada 157ml) e posteriormente incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente também em tampão RB I. Após, as amostras foram lavadas uma vez com tampão RB II (KCl 1M 10ml, MgCl₂ 0,1M 10ml, EGTA 0,5M 400 μ l, PMSF 0,5M 500 μ l, PIC 1M 40 μ l, pirofosfato 0,1M 2ml, água autoclavada 178ml) e em seguidas incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos em tampão RB II. Em seguida as amostras foram lavadas com LSB (Tris 1M 5ml, MES 1M 5ml, DTT 1M 200 μ l, Triton X-100 200 μ l, PMSF 0,5M 500 μ l, PIC 1M 40 μ l e água autoclavada 189 ml), sendo também incubadas em LSB por três

minutos no gelo. As placas foram então raspadas e as amostras transferidas para tubos de 15 ml, os quais foram submetidos à agitação por vórtex durante 10 segundos e centrifugação a 9000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação todo o sobrenadante foi removido e o pellet residual foi ressuscitado em até 50 µl de tampão de extração nuclear (HEPES 0,1M 1ml, NaCl 1M 250µl, EDTA 0,5M 25µl, DTT 1M 12,5 µl, Glicerol 1,25ml, PMSF 0,5M 0,5µl, PIC 1M 12,5µl, água autoclavada 2,5 ml). Em seguida às amostras foi adicionado NaCl 5M em volume suficiente para atingir a concentração final de 0,45M de NaCl. As amostras foram incubadas no gelo e sob agitação durante 30 minutos, sendo submetidas à posterior centrifugação por 10 minutos, a 4°C sob 14000g. O sobrenadante foi separado e as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford para concentração final de 20µg/ml.

Após quantificação as amostras foram acrescidas de tampão de amostra (2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60mM Tris pH 6.8, 5% de mercaptoetanol, e 0,01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) em aparelho semi-dry transfer (Biorad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 1% de BSA (albumina bovina) em tampão TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos primários (AbCam) contra as proteínas de interesse “overnight” a 4°C.

Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase e expostas ao sistema de detecção Super Signal (Pierce). A expressão das proteínas analisadas foi comparada por quimioluminescência demarcada em membrana, utilizando-se o programa de GeneView Tools Software (SynGene).

4.5. Silenciamento de PGC-1β por antisense

Após os experimentos iniciais foi delimitado o desenho experimental utilizando Tm5 como modelo de melanoma e PGC-1β como alvo experimental, determinando realizar o silenciamento apenas de tal isoforma com a técnica de antisense.

Células das linhagens experimentais Ma e Tm5 foram plaqueadas, novamente, de acordo com os protocolos acima descritos para experimentos de contagem celular (n=12) e PCR (n=12) e extração de proteína (n=8), sendo mantidas em meio desprovido de antibiótico por 24 horas antes do protocolo de transfecção.

O meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS. A cada poço foi adicionado meio de transfecção Opti-MEM (Invitrogen) contendo 5µl de oligonucleotídeos a 1 nM e 1µl de Lipofectamina (Invitrogen), totalizando o volume final de 1000µl/poço para experimentos de PCR e avaliação de proliferação; nas placas de cultura para extração de proteína foi adicionado meio de transfecção Opti-MEM (Invitrogen) contendo 25µl de oligonucleotídeo a 1nM e 5µl de Lipofectamina (Invitrogen). O meio foi mantido por 24 horas e posteriormente retirado e descartado, sendo reestabelecidas as condições de cultura já descritas.

As células em cultura foram avaliadas 24 horas após a transfecção do antisense, sendo submetido a novo experimento de contagem de modo idêntico ao descrito anteriormente, assim como nova avaliação do mRNA por PCR de acordo com a metodologia já discriminada. Para controle da transfecção foi utilizada sequência não-atuante Sense e reagente lipofectamina para experimentos de PCR, sendo estes controles acrescidos de células Tm5 não tratadas para experimento de contagem.

As placas de cultura, também após 24 horas, foram submetidas à extração nuclear e western blotting, se mantendo o protocolo adotado anteriormente.

A sequência dos oligonucleotídeos foi desenhada em colaboração com o Prof. Dr. Licio Velloso, conforme segue abaixo, sendo adicionado fosforotioato às bases orgânicas para fins de viabilização do experimento.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para silenciamento de PGC-1β

Sequência Antisense e Correspondência de Nucleotídeos	
Nucleotídeo Orgânico	Nucleotídeo modificado por Fosforotioato
A	F
T	Z
C	O
G	E
Antisense contra PCG-1β	EOE EZF EFF EEZ OEE C
Sense (scramble)	EOO EFO OZZ OZF OOE C

4.6. Modelo in vivo de melanoma e transfecção de ASO

Camundongos C57/Black machos (n=8) receberam duas injeções subcutâneas, nos flancos direito e esquerdo, cada uma contendo 1×10^4 células da linhagem tumoral Tm5, levando à formação de duas massas tumorais.

Após cada tumor atingir $0,1 \text{ cm}^3$ cada animal foi tratado, em intervalos de 48 horas, com injeções aplicadas diretamente na massa formada, sendo que nos tumores desenvolvidos no flanco direito foram injetados $1 \mu\text{l}$ de lipofectamina, $5 \mu\text{l}$ de oligonucleotídeo sense e Opti-MEM qsp. $10 \mu\text{l}$, sendo este o grupo controle LIPO + SO; nos tumores desenvolvidos nos flancos esquerdos foram aplicadas injeções contendo $1 \mu\text{l}$ de lipofectamine, $5 \mu\text{l}$ de oligonucleotídeo antisense e Opti-MEM qsp. $10 \mu\text{l}$, sendo estes tumores o grupo tratado LIPO + ASO.

O tratamento foi aplicado durante 9 dias em intervalos de 48 horas, sendo realizadas medições de volume tumoral em ambos os grupos experimentais em intervalos regulares de 24 horas.

No nono dia os animais foram sacrificados e os tumores coletados. Após corte histológicos, lâminas de cada grupo tumoral foram coradas em procedimento histoquímico Hematoxilina-Eosina e submetidos à análise por microscopia óptica (Leica). Em cada lâmina foram demarcadas e quantificadas áreas de necrose com utilização do software NR-Elements. Para efeito de quantificação não se fez distinção entre padrões necróticos diversos, foram consideradas todas as áreas com ausência nuclear ou núcleo picnótico; ausência de membrana definida; perda de arquitetura celular e infiltração de vasos sanguíneos excessivos, sugerindo indução de processo inflamatório. Os gráficos de área necrótica expressam porcentagem total de área necrosada em razão da área total de lâminas analisadas.

4.7. Análise de amostras humanas

Lâminas histológicas contendo amostras de melanoma humano e de tecido pigmentado *nevus*, foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Miriam Sotto (Laboratório de Dermatopatologia, Faculdade de Medicina USP), e foram submetidas à detecção de PGC-1 β tecidual por meio de coloração imuno-histoquímica.

Lâminas de ambos os grupos foram incubadas com tampão Citrato de Sódio pH 6 (Citrato de Sódio 10mM, Tween 20 0,05% e água destilada) a 95°C por 20 minutos, sendo mantida na solução em temperatura ambiente por 20 minutos após o aquecimento. Após a incubação as lâminas foram lavadas em solução TBST por 1 minuto.

Após a lavagem, as amostras foram incubadas com 100µl de tampão de bloqueio (Soro Fetal Bovino 5% em TBST) por 20 minutos; após remoção do tampão as amostras foram incubadas com 100µl de TBST com anticorpo primário anti-PGC-1β (AbCam), diluído na razão 1:500, a 4°C overnight.

Em seguida as amostras foram submetidas a quatro lavagens, de cinco minutos cada, com solução TBST, sendo em seguida incubadas com solução de bloqueio DAB (H₂O₂ 3% em metanol) por 10 minutos em temperatura ambiente, subsequentemente sendo incubadas com 100µl de TSBT contendo anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à peroxidase, 1:200 (AbCam), durante 30 minutos, com posterior lavagem em TBST conforme descrito anteriormente.

As amostras foram então submetidas ao sistema de detecção de peroxidase (Sigma) por 30 minutos, seguidos de 4 lavagens com TBST e 1 com água destilada, todas com tempo de cinco minutos, sendo posteriormente submetidas à análise por microscopia óptica.

As áreas demarcadas em região nuclear ou perinuclear foram quantificadas com ajuda do programa NR-Elements (Nikon) e os gráficos de porcentagem de área demarcada foram elaborados utilizando as lâminas de *nevus* como controle.

4.8. Silenciamento de PGC-1β por shRNA

Para o protocolo de shRNA foram realizadas amplificações de quatro sequências de shRNA anti-PGC-1β (QIAGEN) em colônias bacterianas.

Quatro eppendorffs contendo 30µl de meio LB com células bacterianas foram adicionados de 2µl de plasmídeo modificado com shRNA cada – totalizando quatro sequências diferentes entre si de shRNA – e gene de resistência à Geneticina, com posterior incubação em gelo por 10 minutos, seguido de 2 minutos a 45°C e outros 15 minutos de incubação e gelo.

À cada tubo foram adicionados 300µl de meio LB, seguido de incubação sob agitação durante uma hora, a 37°C. 150µl de cada tubo foram plaqueados individualmente em placas de cultura com LB-ágar, enriquecido com 200µl ampicilina 50mg/ml. As placas foram mantidas em estufa durante 10 horas e duas colônias formadas foram selecionadas para nova replicação; cada colônia foi diluída em 5ml de LB acrescido de 10µl de ampicilina, mantendo em agitação, 37°C, overnight.

O meio foi então diluído em 500ml de LB acrescido de 1ml de ampicilina, seguido de nova incubação mantendo os moldes da etapa anterior.

O meio resultante foi então submetido à centrifugação de 10 minutos, a 4°C com velocidade 10000g. O sobrenadante foi descartado e o pellet submetido à purificação de shRNA por Plasmid Maxi Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

As sequências de shRNA amplificadas resultantes foram quantificadas e diluídas em água destilada para concentração final de 1,2µg/µl.

Para a transfecção, células da linhagem Tm5 foram plaqueadas conforme descrito anteriormente e no dia do tratamento o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS. Em cada poço foram adicionados 100µl de solução de transfecção (1,6µg de shRNA, 6µl de veículo Attractene – previamente misturados por 20 minutos em temperatura ambiente – e meio Opti-MEM em qsp. 100µl). Em cada poço também foi adicionado meio RPMI com soro fetal bovino 5% em qsp. 2ml.

As células foram mantidas durante 48 horas nas condições acima, sendo posteriormente submetidas à processo de seleção, no qual as células foram tratadas durante oito dias com meio RPMI contendo geneticina 400µg/ml, em intervalos de 48 horas.

Os poços cujas células sobreviveram ao processo de seleção foram repicados em nova placa de 6 poços, 1 placa para cada sequência shRNA utilizada. Após 48 horas, as células foram submetidas à Real Time PCR de acordo com o protocolo descrito anteriormente para quantificação de RNAm para PGC-1β.

Após os resultados iniciais, o protocolo de transfecção foi novamente realizado em células Tm5, sendo realizado tratamento simultâneo com sequências 1 e 2, com posterior realização de Real Time PCR.

4.9. Análise estatística

Os resultados estão apresentados no formato média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para quantificações de volume, quantidade celular e densidade ótica. Para os experimentos de PCR foi utilizado cálculo sobre variação de gene *housekeeping* - $\Delta\Delta Ct$.

Para verificação de significância entre os dados obtidos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Student-Newman-Keuls, sendo considerados como significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5. Resultados

Neste trabalho colocamos como hipótese central a modulação do co-ativador PGC-1 em células cancerígenas, levando a alterações na sinalização por ele desempenhada e implicando em modificações na relação metabolismo/proliferação celular.

Buscando elucidar tal hipótese, utilizamos como modelo experimental inicial *in vitro* três linhagens celulares, sendo elas *Melan-a* (Ma) – melanócito controle – e linhagens tumorais Tm1 e Tm5. Cabe pontuar que as linhagens tumorais se desenvolveram a partir da linhagem normal Ma através de experimentos de bloqueio de adesão, sem a utilização de agentes carcinogênicos ou manipulação gênica (Oba-Shinjo et al. 2006). Este fato se torna importante na medida em que permite a comparação entre as linhagens em âmbito fenotípico ou genotípico, utilizando o Ma como controle experimental.

Frente aos objetivos do trabalho, propusemos a organização de blocos experimentais de modo a elaborar etapas de acordo com a proposição dos objetivos descritos. Assim sendo, a disposição dos resultados se dará em conformidade com os blocos experimentais propostos.

5.1. Curva de crescimento e condições de viabilidade em cultura.

Estudos descrevem ser a capacidade proliferativa e metastática do melanoma como fator diferenciador do mesmo, o que o tornou alvo intenso de pesquisa, conforme descrito. A fim de realizar a verificação deste marco e estabelecer as diferenças entre os melanócitos normais em cultura frente às células tumorais experimentais, as três linhagens foram submetidas à comparação nos primeiros experimentos realizados, os quais observaram o crescimento das mesmas em condições idênticas de manutenção em cultura celular. Como observado na Figura 4, os melanócitos normais (Ma) apresentam no tempo de contagem 72 horas o dobro do número inicial células plaqueadas. Este tempo de dobramento ocorre para ambas as linhagens tumorais 24 horas após o plaqueamento, portanto nota-se que a taxa de crescimento de Tm1 e Tm5 se encontra aumentada três vezes em relação ao controle. Também nota-se que apesar de apresentarem curvas de crescimento similares, a linhagem Tm1 apresenta maior similaridade na quantidade de células entre os tempos 24 e 72 horas, descrevendo uma curva de crescimento menos pronunciada neste período do que a observada na linhagem Tm5.

A Figura 5 demonstra a viabilidade celular durante a duração do experimento, avaliada pelo critério de exclusão por azul de Tripan. Percebe-se que não há variação significativa da porcentagem de sobrevivência em qualquer linhagem ao longo de 96 horas de contagem. Este resultado demonstra a baixa incidência de morte celular, indicando manutenção adequada das condições de cultura durante o tempo de contagem, atuando como subsídio para validar a curva de crescimento.

Os resultados até aqui apresentados demonstraram que a linhagem Tm5 possui crescimento aumentado em relação a melanócitos normais, apresentando aumento na expressão de ambas as isoformas do co-ativador, fato que permitiu selecioná-la como modelo de linhagem tumoral para elaboração dos desenhos experimentais subsequentes; considerando ainda que se constatou diferença significativa na expressão do co-ativador em sua isoforma β nesta linhagem, decidiu-se também focar os experimentos seguintes em elucidar o possível envolvimento do PGC-1 β e a sinalização por ele desempenhada com o desenvolvimento tumoral.

5.2. Quantificação da expressão gênica de co-ativadores PGC-1 e seleção de modelo experimental.

Uma vez estabelecidas as diferentes taxas de crescimento entre as linhagens tumorais e a linhagem controle – sendo estas reafirmadas através do controle de viabilidade – o passo seguinte se deu no sentido de quantificar a expressão do co-ativador PGC-1 em suas duas isoformas através de Real Time PCR.

A Figura 6 demonstra os resultados obtidos ao analisar a isoforma α ; observa-se o aumento significativo da expressão do co-ativador em ambas as linhagens tumorais quando comparadas à linhagem controle Ma.

A figura 7 apresenta os resultados obtidos ao analisar a isoforma β ; nota-se que neste segundo caso a expressão do co-ativador também se encontra modulada diferentemente nas linhagens tumorais, porém após análise estatística apenas se caracterizou como significativo o aumento de expressão obtido com a linhagem Tm5 em relação à linhagem Ma. Também podemos perceber, de modo geral, que a expressão basal de PGC-1 α – obtida com a linhagem controle – é maior do que a expressão basal da isoforma β .

Figura 4. Células de linhagens tumorais (Tm1 e Tm5) e melanócitos controle (Ma) foram plaqueados de modo similar e o número de células contado diariamente. 24 horas após o início do experimento, já se nota diferença entre a linhagem controle e as linhagens tumorais. Após 48 horas esse fenômeno se mostrou verdadeiro, principalmente na linhagem Tm5.

N = 6 para cada grupo. * $p < 0.05$ Tm1, Tm5 x Ma.

Figura 5. O gráfico de sobrevivência celular demonstra que os valores de crescimento obtidos na figura 4 não se devem à mortalidade celular, uma vez que a exclusão por azul de Tripan contabilizou níveis semelhantes de viabilidade entre os grupos. N= 6 para cada grupo.

Figura 6. As linhagens tumorais Tm1 e Tm5 apresentaram maiores níveis de RNAm para PGC-1 α do que a linhagem controle Ma . Os resultados estão expressos em porcentagem do controle, normalizados utilizando os valores de expressão do housekeeping GAPDH. n = 6 para cada experimento. *p<0.05 Tm5, Tm1 x Ma

Figura 7. De modo semelhante ao observado na Figura 6, as linhagens tumorais também apresentam maiores níveis de RNAm para a isoforma β do co-ativador, contudo, apenas a linhagem Tm5 possui diferença estatisticamente significativa.

N = 6 para cada experimento. * $p < 0.05$ Tm5 x Tm1, Ma.

5.3. Silenciamento Gênico

Tendo selecionado uma linhagem experimental e uma isoforma alvo de análise, os experimentos seguintes buscaram estabelecer uma relação causal entre o aumento da expressão gênica de PGC-1 β e a proliferação celular observada inicialmente. Para tal objetivo, realizou-se o procedimento de silenciamento gênico mediado por oligonucleotídeo antisense (ASO).

As figuras 8 e 9 expõem os resultados obtidos por Real Time PCR após o procedimento de transfecção para as expressões da isoforma β e α , respectivamente. Nota-se que há redução significativa da expressão para o PGC-1 β , estando esta 70% menor em relação aos grupos controles LIPO, o qual não recebeu a sequência, e LIPO+SO, cuja sequência utilizada não interage com o RNAm do co-ativador. Quanto ao PGC-1 α , nota-se que não há diferença significativa entre os valores obtidos no grupo controle em relação ao grupo tratado com ASO. Estes dados refletem a especificidade da sequência utilizada, resultando em níveis menores apenas da isoforma β do co-ativador.

Tendo sido observado redução nos níveis de RNAm do co-ativador avaliou-se o impacto desta redução na tradução proteica do gene. A verificação dos níveis proteicos foi realizada através de western blotting para PGC-1 β com as linhagens controle Ma, tumoral Tm5 e das células tratadas com ASO, como se observa na figura 10.

Percebe-se que há diferença significativa entre a quantificação proteica das linhagens controle e tumoral, sendo estes níveis três vezes maiores em Tm5 do que em Ma; também nota-se a redução significativa dos níveis proteicos em células Tm5 pós-transfecção, representando uma diminuição de quatro vezes quando comparadas à linhagem tumoral. O resultado obtido em western blotting suporta os dados da Real Time PCR, confirmando redução tanto do RNAm quanto de sua tradução em proteína, uma vez que as células tenham sido tratadas com ASO.

Figura 8. Níveis reduzidos de RNAm para PGC-1 β podem ser observados em células Tm5 tratadas com o oligonucleotídeo antisense (ASO) quando comparadas às células tratadas somente com o veículo (LIPO) ou com veículo combinado com oligonucleotídeo sense (SO).

N = 8, * $p < 0.05$ LIPO+ASO x LIPO, LIPO+SO.

Figura 9. Não se observam diferenças significativas entre os grupos quando se analisa a expressão de PGC-1 α , indicando que o tratamento utilizado não interfere de forma inespecífica com a isoforma α do co-ativador. N = 8

Figura 10. Como esperado, a expressão da proteína detectada por Western Blotting segue os padrões obtidos com o RNAm. Células tratadas com ASO apresentam níveis reduzidos da proteína PGC-1 β quando comparadas às células tumorais, estando com valores similares àqueles obtidos em melanócitos normais, demonstrado no gráfico de modo quantitativo, considerando o todo experimental, e de modo representativo na figura obtida a partir da revelação das membranas pelo sistema SuperSignal (Pierce), abaixo do gráfico.

N = 8, * $p < 0.05$ LIPO+ASO x Tm5

5.4. Avaliação dos efeitos do silenciamento sobre a cadeia de sinalização.

Verificada a redução de expressão, se faz necessário avaliar a atividade da proteína em função do tratamento com a sequência antisense. Foram selecionados três genes indicadores, cuja expressão é PGC-1 β -dependente; o RNAm destes foi avaliado por Real Time PCR e os resultados se encontram nas figuras 11, 12 e 13.

Observa-se que a expressão dos genes NRF-1 (fig. 8) e TFAM (fig. 9) se encontram reduzidas nos grupos que receberam o tratamento em relação aos grupos LIPO e LIPO+SO (controles) e Tm5, sendo notável a redução de aproximadamente 90% da expressão gênica de NRF-1, responsável pelo início da cadeia de biogênese mitocondrial. A Figura 40 ilustra a expressão de APOC3, porém nota-se o quadro inverso, havendo aumento do RNAm produzido nos grupos controle LIPO e LIPO+SO em relação à linhagem experimental Tm5, a despeito da redução obtida – ainda que não significativa – no grupo LIPO+ASO.

Ainda no sentido de avaliar o impacto do silenciamento gênico na cadeia de sinalização, analisamos o Dloop utilizando como referência de padronização o gene da subunidade ribossomal 18s. Esta quantificação busca avaliar o genoma mitocondrial (mtDNA) através da quantificação de cadeias de DNA não-codificantes (D-Loop), marca significativa do genoma mitocondrial, sendo, portanto reflexo do número de mitocôndrias presentes na célula. Como observado na Figura 14, não há diferenças significativas entre os grupos analisados no tangente ao Dloop, indicando, de modo indireto, também não haver diferenças significativas entre a quantidade de mitocôndrias presentes nas células dos grupos controle LIPO e tratado LIPO+ASO, em relação à linhagem tumoral Tm5.

O que se percebe neste momento é a existência da relação direta entre os genes PGC-1 β dependentes, sendo que a redução do co-ativador impactou na expressão de tais genes, sem que haja, entretanto, impacto no final da cadeia de sinalização mitocondrial, o que mantém a quantidade de mitocôndrias inalterada.

Figura 11. Avaliação do RNAm de NRF-1. Buscando determinar o impacto do tratamento com ASO sobre a cadeia de sinalização mediada por PGC-1 β os níveis de RNAm de duas proteínas dependentes do co-ativador para transcrição foram medidas por Real Time PCR. O primeiro gene analisado se tratou do NRF-1, cuja expressão se mostrou reduzida no grupo tratado com ASO em comparação aos grupos controle.

N = 8, * $p < 0.05$ LIPO + ASO x LIPO; LIPO+SO.

Figura 12. O segundo gene alvo direto de PGC-1 β analisado foi o TFAM. De modo semelhante ao observado na figura 8, no grupo tratado com ASO em comparação aos grupos controle, observou-se redução dos níveis de RNAm, confirmando redução efetiva na atividade proteica do co-ativador e, portanto, sinalizando silenciamento efetivo com o processo de transfecção.

N = 8, * $p < 0.05$ LIPO + ASO x LIPO; LIPO+SO.

Figura 13. Avaliação do RNAm de APOC3. A atividade de genes ligados ao PGC-1 β de maneira indireta também foi verificada por quantificação de RNAm por Real Time. O gene APOC3 apresentou aumento na expressão quando tratado com LIPO+SO. Este gene se liga à inibição da captação de lipídeos e lipoproteínas pela célula, indicando que o aumento de sua expressão possa estar ligado à forma de transfecção utilizada (Lipofectamina).

N = 8, * $p < 0.05$ LIPO+SO x LIPO; LIPO+ASO; Tm5.

Figura 14. Avaliação quantitativa de mitocôndrias por quantificação de DLoop. Ainda procurando avaliar o impacto da transfecção sobre a cadeia de sinalização mediada pelo co-ativador obtivemos os níveis de Dloop. O Dloop representa indiretamente a quantidade de mitocôndrias na célula. Não houve alterações significativas entre os grupos, a despeito da redução efetiva do NRF-1, como trazido na figura 8, gene iniciador da via de sinalização de biogênese mitocondrial. N=8.

5.5. Avaliação dos efeitos do silenciamento sobre a proliferação celular.

Considerando os resultados anteriores, percebe-se a efetividade do protocolo adotado quanto ao silenciamento gênico no tangente à RNAm e sua tradução, bem como seus impactos sobre a via de sinalização dependente do co-ativador, logo, em seguida procurou se evidenciar o efeito da transfecção sobre a proliferação celular, objetivando estabelecer uma conexão efetiva entre a expressão do co-ativador e a capacidade de crescimento da linhagem tumoral Tm5.

As células Tm5, os grupos controle (LIPO e LIPO+SO) e tratado (LIPO+ASO) foram submetidos a novo experimento de contagem sob as mesmas condições de cultura e o gráfico obtido está ilustrado na Figura 15.

Como demonstrado no gráfico, é possível observar que Tm5 e os grupos controle apresentam resultados similares, se aproximando das curvas obtidas no primeiro experimento de contagem realizado, o que significa dizer que ambas mantêm o tempo de dobramento em aproximadamente 24 horas após o plaqueamento inicial; também é possível perceber que a curva para Tm5 se mantém nos padrões anteriores, traçando uma trajetória exponencial ao longo da duração do experimento. O grupo controle LIPO apresenta estática do crescimento entre os tempos 24 e 48 horas, porém descreve a mesma trajetória exponencial de crescimento após este tempo, apresentando um número médio de células por placa semelhante ao obtido com Tm5 e LIPO+SO em 72 horas. Contudo, o grupo LIPO+ASO apresenta uma curva de crescimento reduzido, mantendo o número médio de células por poço em torno de 1×10^5 até 48 horas, apresentando o dobro de células por poço após 72 horas decorridas do plaqueamento, resultado semelhante ao obtido com a linhagem controle Ma, como já trazido na Figura 4.

Como controle da construção desta curva de crescimento realizou-se novamente a contagem de células viáveis utilizando o critério de exclusão de azul de Tripan. A Figura 16 mostra a porcentagem de sobrevivência dos grupos ao longo da duração do experimento.

Figura 15. O padrão de crescimento das células tumorais Tm5 foi alterado pela transfecção com ASO, levando ao aumento do tempo de proliferação. Os grupos controles não tratados apresentam padrão de crescimento inalterado, similar ao obtido inicialmente (Figura 4). Notar que os tratamentos com veículo apenas ou com SO não interferem no crescimento das células tumorais.

N= 6 * $p < 0.05$ LIPO + ASO vs LIPO, LIPO+SO, Tm5

$p < 0.05$ LIPO + ASO vs LIPO+SO, Tm5 – Em 48 horas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos LIPO e LIPO+ASO

Figura 16. A avaliação da sobrevivência celular foi novamente realizada utilizando o critério de exclusão por azul de Tripan. Novamente, todos os grupos apresentaram viabilidade em torno de 90%, indicando serem os resultados obtidos no painel A não relacionados à morte celular. N= 6

Nota-se que em todos os casos os valores de sobrevivência se encontram em torno de 90% para os todos os momentos de contagem em todos os grupos experimentais. Este resultado demonstra novamente a manutenção de condições ideais de cultura e reitera os valores obtidos com a curva de crescimento, denotando que a contagem obtida não se deve ao fato das células terem apresentado elevada mortalidade, fato este que reduziria o número de células.

Os dados apresentados até este momento denotam uma proliferação aumentada de células tumorais em relação a melanócitos normais, acompanhando o níveis de mRNA do co-ativadores PGC-1; uma vez bloqueada a expressão da isoforma β do co-ativador há redução na proliferação celular sem que hajam impactos na viabilidade ou indução à morte celular, indicando a existência da relação efetiva entre a sinalização desempenhada por PGC-1 β e a capacidade proliferativa.

5.6. Inoculação de células e tratamento com ASO *in vivo*.

Demonstramos até este momento haver uma relação entre a capacidade proliferativa de células tumorais de melanoma *in vitro* e o co-ativador PGC-1 β , sendo a redução da velocidade de proliferação proporcional à redução da expressão gênica do co-ativador, assim como impactos da via de sinalização por ele mediada.

Descrito tal fenômeno, percebeu-se a necessidade de avaliar o comportamento das células *in vivo* e observar se haveria efetividade do tratamento em tumores efetivamente desenvolvidos.

A linhagem Tm5 apresenta uma propriedade interessante no tangente à inoculação subcutânea, sendo capaz de levar à formação de massas tumorais. Utilizou-se tal propriedade para produção de modelo *in vivo* de melanoma em camundongos C57/black machos. Os animais desenvolveram dois tumores de 0,25cm³, um em cada flanco, após 24 horas contadas da inoculação inicial. Assim que se atingiu tal volume tumoral, cada animal recebeu injeções diretamente nos tumores formados, ficando o tumor no flanco direito como controle, sendo tratado apenas com a sequência sense (controle, não relacionada ao silenciamento gênico), e o tumor no flanco esquerdo recebendo tratamento com a sequência antisense. As injeções foram realizadas em intervalos de 48 horas, porém cada tumor foi medido em intervalos de 24 horas. Os resultados obtidos se encontram na curva de crescimento disposta na Figura 17.

Figura 17. Crescimento tumoral in vivo nos grupos LIPO+ASO e LIPO+SO. Células tumorais Tm5 foram implantadas em ambos os flancos de camundongos C57 Black machos, levando ao desenvolvimento de pequenos tumores após 24 horas. Os tumores formados no flanco direito foram tratados com oligonucleotídeo antisense contra PGC-1 β , ao passo que aqueles implantados no lado esquerdo receberam oligonucleotídeo sense, ambos os tratamentos utilizando lipofectamina como veículo. Os tumores tratados com ASO apresentaram redução notável na velocidade de crescimento desde o segundo dia de tratamento. Ao final de nove dias, os tumores tratados com oligonucleotídeo antisense apresentaram um volume final 50% menor do aqueles tratados com oligonucleotídeo sense.

N = 8 * $p < 0.05$ LIPO+ASO vs LIPO+SO.

Pode-se observar um crescimento exponencial e constante em ambos os grupos experimentais, porém nota-se manutenção do volume inicial no grupo tratado com antisense (ASO) até o terceiro dia após o início do tratamento, apresentando volume de aproximadamente $0,25 \text{ cm}^3$ durante tal intervalo experimental, fato que não se nota no grupo controle, cujo crescimento é contínuo desde o momento inicial. Também nota-se que as trajetórias descritas pelas curvas demonstram menor velocidade de crescimento dos tumores tratados, implicando em uma redução de aproximadamente 50% quando comparada ao grupo controle. Considerando ainda os valores médios finais dos tumores desenvolvidos após nove dias de experimento percebe-se serem também 50% menores aqueles medidos no grupo tratado, apresentando valor médio de $0,75 \text{ cm}^3$ enquanto o grupo controle apresenta o valor médio $1,50 \text{ cm}^3$.

Objetivando verificar se tal resultado não se devia à necrose tumoral, cortes histológicos de ambos os grupos foram analisados em microscopia óptica e as áreas necróticas foram contabilizadas com auxílio de coloração HE e posteriormente quantificadas em gráficos representativos dos grupos controle (SO) e tratado (ASO); não se fez diferenciação entre subtipos de necrose, sendo contabilizada a área total de tecido necrosado nas amostras dos dois grupos. A figura 18 mostram os resultados obtidos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as áreas de necrose dos grupos, estando ambos com área de tumor viável entre 70% e 80%, implicando no fato dos resultados obtidos com a curva de crescimento não estarem diretamente ligadas à mortalidade tumoral.

As figuras 19A e 19B trazem fotomicrografias representativas dos grupos tumorais. As setas indicam áreas consideradas como necrose pra efeitos de análise. Não foram observadas alterações grosseiras na estrutura tumoral, sendo a estrutura tecidual preservada nos grupos controle e tratado. Articulando estes resultados, temos suporte para confirmação dos dados demonstrados com a curva de crescimento tumoral não se deverem à alterações morfológicos ou necrose tecidual.

Figura 18. Não foram observadas diferenças entre as áreas de necrose apresentadas entre os grupos tratado (ASO) e controle (SO). Ambos apresentaram área necrosada aproximada de 20% no tecido, sugerindo não serem o trauma provocado pelas injeções ou o veículo da transfecção responsáveis pela redução de crescimento observada. N = 8 por grupo experimental

A.

B.

Figura 19. Micrografias representativas dos tumores controle (SO) (A) e tratados (ASO) (B) após coloração por HE. Em ambos os casos, áreas similares de necrose podem ser observadas, assim como vasos sanguíneos e células inflamatórias. N= 8 por grupo experimental, figuras representativas.

5.7. Expressão de PGC-1 β em melanoma humano

O passo seguinte se deu no sentido de verificar padrão semelhante em amostras de humanos. Lâminas de melanoma e de nevus foram doadas pelo Laboratório de Dermatopatologia da FMUSP. O nevus foi utilizado como controle experimental por ser um tecido também pigmentado por melanina, porém não tumoral. Este fator se faz relevante em função da recente implicação do PGC-1 β com o processo melanogênico em função da exposição à radiação UV (Shoeg et al., 2013). A expressão do co-ativador foi avaliada por meio de coloração imuno-histológica e analisada em microscopia óptica (Leica) e software NR-Elements (Nikon).

As figuras 20A e 20B trazem micrografias representativas dos grupos Melanoma e Nevus, respectivamente, após coloração anti-PGC-1 β . As setas indicam áreas de coloração intensa representativas da presença do co-ativador em áreas nuclear e perinuclear. Após análise por microscopia ótica, os resultados foram dispostos no gráfico da Figura 21.

Como se observa, as lâminas de melanoma apresentam maior quantidade de áreas demarcadas quando comparadas ao grupo controle. Nota-se que a porcentagem de área corada nas amostras de melanoma é aproximadamente três vezes maior do que área corada em lâminas de nevus, sugerindo, portanto, maior expressão do co-ativador também em humanos.

Os resultados obtidos *in vivo* demonstram padrões semelhantes aos obtidos em cultura, trazendo à tona o fato do tumor tratado com ASO apresentar menor velocidade de crescimento desligado de morte celular, indicando redução da capacidade proliferativa. Estes dados abrem perspectivas futuras ao trabalho e propõe a possibilidade de novas formas de abordagem ao melanoma. Frente a este fato, buscamos ainda trabalhar outra possibilidade de desmembramento futuro.

A.

B.

Figura 20. Imuno-histoquímica contra PGC-1 β em lâminas de melanoma e nevus humanos. Buscando determinar se os dados obtidos anteriormente também seria verdadeiros em tecidos humanos, a expressão de PGC-1 β foi testada em lâminas de melanoma humano. Como observado no painel A, o co-ativador foi marcado em área nuclear e perinuclear em tecido de melanoma (setas). Em amostras de nevus – tecido pigmentado não maligno – (painel B) não se observa a mesma intensidade de marcação, estando os pontos escassos e em sua maior parte ausentes do núcleo. N=5 para cada grupo, figuras representativas.

Figura 21. Gráfico quantitativo das marcações por Imuno-histoquímica trazida nos painéis A e B da figura 20, obtido com o software NR-Elements software (Nikon). A expressão de PGC-1 β se encontra aumentada em melanomas quando comparada aos nevi.

N = 5, *p<0.05 Melanoma vs. Nevus.

5.8. Silenciamento *in vitro* por shRNA

Os experimentos seguintes se desenvolveram buscando uma forma de tratamento duradoura para reduzir a expressão do co-ativador. Isto se deve em função do oligonucleotídeo ser de durabilidade restrita, estando sujeito à degradação pela maquinaria celular, razão pela qual se dá a aplicação intermitente de injeções no modelo animal.

Buscando viabilizar a redução da expressão do co-ativador em caráter permanente foi realizado o experimento de transfecção de plasmídeos bacterianos contendo sequência codificadora de shRNA para PGC-1 β . Após a seleção por meio antibióticos, células que incorporaram o plasmídeo foram mantidas em cultura e a expressão de do co-ativador foi quantificada, como trazido na Figura 22. É possível perceber que houve redução da expressão gênica nos grupos de clones (plasmídeos) 1 e 2 quando comparados aos grupos não tratados, tratados somente com o vetor (ATR) e também com o clone 4, cuja sequência inserida no plasmídeo não deve interferir na expressão, atuando portanto como sequência gênica de controle.

Ainda foi realizada a transfecção simultânea dos plasmídeos 1 e 2, cuja ação isolada apresentou maior efeito; uma vez combinados obtêm-se uma redução quase total da expressão, em torno de 98%, demonstrando portanto o silenciamento efetivo do gene também por shRNA, o que sugere o estabelecimento de células tumorais cuja expressão de PGC-1 β tenha sido reduzida de modo permanente, sendo este apenas um experimento pioneiro para a verificação da interferência deste procedimento na proliferação e outros aspectos relacionados à linhagem tumoral Tm5. Em síntese, os resultados aqui trazidos mostram que PGC-1 β está super expresso tanto em células de melanoma murino quanto humano e que sua inibição pode implicar na redução de velocidade de proliferação celular e tumoral em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Estes dados implicam no estabelecimento de novas vias de sinalização, as quais poderiam ser utilizadas como futuros alvos para o tratamento de melanoma.

Figura 22. O gráfico representa a quantificação dos níveis de RNAm do co-ativador após transfecção de plasmídeos bacterianos implantados com sequências de shRNA contra PGC-1 β . Nota-se a redução da expressão gênica em células transfectadas com o clone (plasmídeo) 2 e ainda uma redução massiva dos níveis de RNAm quando se trata as células com os clones 1 e 2 simultaneamente. Foram utilizados como controles o veículo de transfecção (Attractene) e o plasmídeo 4, cuja sequência não interfere na expressão do RNAm para PGC-1 β . Estes dados são indicativos da possível criação de uma linhagem tumoral que expresse níveis mínimos de PGC-1 β , considerando ser o shRNA transfectado mantido em citoplasma a despeito do processo de divisão celular ou tempo em cultura.

N=6; * $p < 0.05$ Clone 2 vs. Atr, Tm5, Clone 4.

$p < 0.01$ Clone 1+2 vs. Atr, Tm5, Clone 4, Clone2

6. Discussão

Muito progresso foi alcançado na última década em relação à descoberta de novas formas de tratamento para o melanoma (Hodi et al. 2010; Flaherty et al. 2012), contudo a taxa de sucesso destes ainda é ínfima quando comparado a outros tipos de câncer (Gray-Schopfer et al. 2007). O baixo índice de sucesso dos tratamentos recai sobre dois fatores principais: o diagnóstico tardio e a habilidade invasiva e metastática das células tumorais (Masood e Al-Jumaily, 2013). A dificuldade de diagnosticar com sucesso a doença, a despeito de diversos mecanismos desenvolvidos para tal – incluindo *scan* dermatológico associado a algoritmo computadorizado – implica também na adoção tardia, ou não adoção, do procedimento de remoção cirúrgica, o qual apresenta 95% de sucesso quando realizado no estágio inicial do melanoma (Hauschild e Eggermont, 2009).

Considerando que a remoção cirúrgica não apresenta a mesma taxa de sucesso uma vez que se observe difusão do tumor e metástase, os tratamentos adotados incluem a quimioterapia baseada em Decarbazina (DTIC), Interleucina 2 (IL-2) e Intérferon- α 2b (IFN- α 2b), com taxa de sucesso de apenas 10% no melhor dos cenários, ainda associado à baixa expectativa de vida (Slipicevic e Herlyn, 2012). Este quadro descreve a necessidade da busca por novas vias de sinalização envolvidas com a proliferação e capacidade invasiva de células do melanoma, as quais poderiam atuar como novos alvos terapêuticos.

Este trabalho busca descrever a relação do co-ativador de transcrição PGC-1 β com o melanoma, tendo demonstrado que sua expressão se encontra aumentada nas células tumorais em relação a melanócitos normais em modelo murino, assim como também se observa tal aumento de expressão em melanoma humano.

Ainda descrevemos serem a proliferação celular e o desenvolvimento tumoral impactados e reduzidos quando induz-se inibição da expressão gênica do co-ativador.

O modelo experimental adotado se baseou em três linhagens celulares sendo Melan-a (Ma) o melanócito normal, utilizado como controle experimental, e duas linhagens tumorais derivadas de Melan-a, Tm1 e Tm5. As linhagens tumorais foram obtidas a partir de experimentos consecutivos de bloqueio de adesão à placa de cultura (Oba-Shinjo et al., 2006), de modo a adquirirem crescimento ancoragem-independente – um marco indicativo de transformação neoplásica (Hanahan e Weinberg, 2011), sendo este o gatilho de alterações carcinogênicas – a exemplo de alterações morfológicas e expressão

de glicosaminoglicanas sulfatadas – as quais se relacionam com o processo de interação célula/célula ou célula/matriz. Contudo, tem-se como fato marcante deste modelo a ausência de manipulação gênica ou tratamento com agentes carcinogênicos, o que significa dizer que o genótipo das linhagens não foi alterado, permitindo que as três linhagens sejam comparadas diretamente em relação à expressão de seus genes, uma vez que não se observa mutação gênica, o que nos leva a supor que as alterações encontradas se devem à variações de controle epigenético, desencadeadas pelo processo acima mencionado (Oba-Shinjo et al., 2006).

Como esperado, as células Tm1 e Tm5 apresentaram taxa de proliferação aumentada quando comparadas à linhagem parental não-tumoral Ma. Conforme observado, os melanócitos normais apresentaram tempo médio de dobramento de 72 horas decorridas do plaqueamento inicial, ao passo que ambas as linhagens tumorais realizaram o dobramento, ou seja, atingiram o duplicaram-se de modo a dobrar o inicial de células plaqueadas, em 24 horas após serem plaqueadas, nos permitindo confirmar que tais células apresentam proliferação três vezes mais rápida do que melanócitos normais.

Também se pôde notar uma pequena diferença entre Tm1 e Tm5 no intervalo entre 48 e 72 horas, a qual apesar de não significativa, apresentou um indício inicial de melhor crescimento em cultura da linhagem Tm5, considerando que esta apresentou maior número de células em todos os momentos de contagem, replicando os dados da descrição inicial destas linhagens, denotando que elas diferem quanto à capacidade proliferativa e produção de pigmento.

Os dados obtidos com a curva de crescimento são reforçados pela observação do gráfico de sobrevivência celular. Este gráfico foi elaborado utilizando o critério de exclusão por azul de Tripán; este composto ao ser colocado em contato com as células indica morte celular quando observada coloração azul no interior da célula. Este fenômeno ocorre por que células vivas mantêm o reagente fora da região citoplasmática se valendo do transporte ativo de membrana, o que requer manutenção das reações vitais na célula; estando o citoplasma azulado, tem-se o sinal de qual não há transporte ativo e, portanto, morte celular (Avelar-Freitas et al., 2014).

A figura 5 mostra que não se observam alterações significativas quanto à viabilidade das três linhagens durante o período de experimento, sendo observada taxa de sobrevivência em torno de 80% em todos os grupos. Novamente, nota-se que existe um indicativo de maior viabilidade *in vitro* de células Tm5 quando comparadas a células Tm1;

a primeira linhagem mencionada mantém a viabilidade próxima de 100% em todos os momentos, porém entre os períodos de 48 e 72 horas percebe-se que a viabilidade de Tm1 se encontra em torno de 85 à 80%. Novamente cabe ressaltar a não observância de significância entre estes valores, porém estas observações serão importantes quando apresentarmos os parâmetros de escolha de linhagem experimental efetiva. Em síntese, a taxa de sobrevivência nos permite afirmar que a curva de crescimento observada não se deve à mortalidade ou inviabilidade celular.

Quando, em seguida, comparamos os níveis de RNAm para as isoformas α e β entre as linhagens também se observa aumento na expressão de PGC-1 α nas células tumorais Tm1 e Tm5 quando comparadas à Ma, ao passo que se observa aumento significativo de PGC-1 β apenas em células Tm5 uma vez que esta se compare às outras duas linhagens. Recentemente a isoforma β foi implicada como participante crucial no processo melanogênico através da ativação do fator de transcrição MITF em resposta a exposição à luz UV, desempenhando papel importante no processo de bronzeamento da pele (Shoag et al., 2013).

Como trazido anteriormente, a linhagem Tm1, diferente das linhagens Ma e Tm5, se demonstrou incapaz de produzir pigmento, de tal modo que este fator poderia se relacionar aos dados obtidos quanto à expressão diferenciada de PGC-1 β . Contudo, tanto a linhagem parental Ma quanto a linhagem tumoral Tm5 apresentam igual produção de melanina, o que permite compará-las igualmente, estando, portanto desligado o aumento de PGC-1 β encontrado em Tm5 da capacidade de produção de melanina.

Considerando os fatos apresentados até o momento, optou-se por selecionar a linhagem Tm5 como modelo experimental efetivo, trazendo como indícios iniciais o comportamento mais estável desta em cultura do que aquele apresentado por Tm1, conforme trazido anteriormente, tomando ainda como maior fator de relevância os dados obtidos por Real Time quanto à expressão de PGC-1 β ; sendo a linhagem tumoral Tm5 capaz de produzir pigmento em cultura, semelhante à Ma, e não se observando esta capacidade em Tm1, optou-se por não estudá-la enquanto comparativo à Ma no tangente à expressão do co-ativador, uma vez que o fato desta não ser um célula pigmentada poderia levar a dados não passíveis de comparação, e portanto, não confiáveis no que diz respeito ao objetivo do trabalho.

Outra seleção feita do ponto de vista experimental se deu na opção por focar o trabalho na ação específica da isoforma β . Os trabalhos que envolvem PGC-1 e câncer em

sua grande maioria detêm atenção ao papel desempenhado por PGC-1 α , dada sua expressão mais facilmente detectável e controlável, o que por vezes direciona diversos trabalhos a focar somente nesta isoforma e buscar estabelecer sua relação com alterações metabólicas; uma publicação recente (Bhalla et al., 2011) descreve de maneira elegante a via de sinalização mediada por PGC-1 α no processo de proliferação e crescimento tumoral, associando-o à lipogênese e metabolismo de ácidos graxos através da ativação da enzima FAS.

A despeito da isoforma focal de tal publicação, é inegável haver ganho significativo residindo no fato de demonstrar a importância de vias metabólicas para a progressão tumoral, o que define um novo paradigma acerca da relação metabolismo/câncer, em especial no tangente ao efeito Warburg – o qual propõe a glicólise como via principal de obtenção de energia em células tumorais – negando por longo tempo a influência das mitocôndrias e demais vias metabólicas na progressão tumoral.

Ainda neste foco de pesquisa, outra publicação (Vazquez e col., 2013) se mostrou de grande interesse por apontar achados semelhantes aos apresentados na publicação descrita, utilizando especificamente modelos de melanoma, atuando como indicativo do correto viés experimental utilizado ao abordarmos as linhagens de melanoma Tm5 e Tm1, uma vez que a relação melanoma/PGC-1 se trata de um campo ainda pouco investigado. Em tal publicação, se destaca o fato de tumores de origem e microambientes tumorais diferenciados também apresentarem respostas metabólicas diferenciadas, exemplificando não só a via glicolítica, mas também a via oxidativa e ainda a via de degradação de aminoácidos, pontuando ainda que a desregulação energética, em alguns casos, leva à alterações nos níveis de ROS, podendo haver efeito citotóxico, de tal modo que o PGC-1 α surgiria como elemento central na regulação da produção de tais espécies, podendo definir características específicas de tumores em função de sua atividade.

Neste sentido, os autores comparam diversos modelos tumorais, denotando, em última instância, haver sobreposição de valores elevados do co-ativador com variações de melanoma, dando início à pesquisa, a qual revelou haver influência metabólica de PGC-1 α não somente na regulação do dano por ROS, mas também na regulação metabólica, ao passo que o silenciamento do co-ativador implicou na redução da fosforilação oxidativa e redução da disponibilidade energética, levando as células à morte (Vazquez e col., 2013).

Entretanto, novamente as relações metabólicas associadas somente ao PGC-1 α tomam destaque nas discussões, porém não se discute os possíveis envolvimento das

demais isoformas, ainda que trabalhos descritores iniciais demonstrem haver funções diferenciadas entre os membros (Guiguère, 2008; Buchakijan e Kornbluth, 2010), sugerindo, deste modo, diferentes relações dos membros com o câncer; assim sendo, e tendo observado a variação da isoforma β na linhagem tumoral Tm5, optamos por desenvolver o trabalho sob este novo foco.

Os dados de crescimento e de Real Time PCR implicaram na concomitância de crescimento acelerado e aumento da expressão gênica de PGC-1 β em Tm5 quando comparado à Ma, contudo não demonstram uma relação causal entre os eventos. Em busca de estabelecer a possível relação efetiva entre os dados, o protocolo adotado se deu no sentido de bloquear a atividade de PGC-1 β em Tm5, observando os impactos do procedimento sobre a proliferação celular.

O que se notou ao adotar tal procedimento foi a inexistência de drogas ou compostos capazes de bloquear a ação de PGC-1 β descritos em literatura. Frente a tal situação, a escolha feita recaiu sobre o uso de sequência de oligonucleotídeo antisense (ASO). Os ASO são compostos sintéticos baseados na sequência antisense do RNAm do gene de interesse, de modo que sua sequência é complementar e contrária à sequência do gene no qual se deseja interferir. Uma vez dentro da célula, o ASO é direcionado ao núcleo e se liga de forma específica ao RNAm, criando uma sequência fita dupla de RNA, a qual se torna reconhecida e alvo pela enzima RNase-H. Uma vez reconhecida pela enzima, a dupla fita de RNA é clivada, implicando no impedimento da tradução do RNAm em proteína funcional (Dias e Stein, 2002). Considerando que a célula não seja capaz de apresentar a proteína ativa, o papel do PGC-1 β enquanto co-ativador seria impossibilitado, debilitando as vias dependentes, o que nos permite considerar a redução efetiva da expressão gênica.

Nos dados obtidos percebemos que tal abordagem se mostrou altamente efetiva, reduzindo os níveis de RNAm do co-ativador em aproximadamente 80% quando comparado aos controles LIPO e LIPO+SO. O uso destes grupos controle se deve à forma de *delivery* do ASO. Para garantir que a sequência chegue ao citoplasma – e assim reconhecida pela célula e dirigida ao núcleo – a sequência é envolta em vesículas lipídicas (reagente Lipofectamina) de modo a permitir fusão destas com membrana e, consequentemente, entrada do oligonucleotídeo no citoplasma.

Deve-se considerar a interação do reagente com a célula, contudo, somente sua presença não interfere de modo efetivo na ação do ASO, o que torna controle da reação,

sendo indicativo do efeito se dever à ação do tratamento e não da forma de contato da célula com o mesmo. De modo similar, o grupo LIPO+SO atua como forma de verificar se somente a entrada de uma sequência exógena à célula poderia influenciar na expressão gênica; a sequência oligonucleotídeo sense também representa um produto sintético de RNA, cuja sequência é randomizada de modo a não se sobrepor a sequência de RNAm do gene de interesse, ou seja, apesar de entrar na célula, a sequência SO não deve ser capaz de ativar a maquinaria de clivagem e, portanto, não deve interferir na expressão do gene. Estes dois grupos permitem avaliar a eficácia do tratamento com ASO levando em conta o fato de não se observarem alterações na expressão de PGC-1 β entre eles, havendo, entretanto, redução dos níveis de RNAm no grupo tratado com ASO.

Ao realizar o western blotting observamos haver também redução da proteína em aproximadamente 85% quando comparamos com o grupo normal Tm5 – sem tratamentos – o que nos permite avaliar a presença do co-ativador em células tumorais antes e depois da inserção de ASO, representando níveis proteicos pós-tratamento menores do que aqueles obtidos em melanócitos normais.

Apesar de termos observado redução no RNAm, se faz necessário avaliar também a expressão da proteína não somente como forma complementar de análise, mas pelo fato dos co-ativadores PGC-1 possuírem uma capacidade singular no que diz respeito à ação proteica: a regulação da produção de RNAm, assim como o splicing deste – o que determina efetivamente qual isoforma será produzida – podem ser feitas através de um *looping* auto regulatório mediado pela própria proteína (Handschin e Spiegelman 2006); a família PGC-1 é capaz de se ligar à fatores de transcrição específicos de acordo com o estímulo e elevar a transcrição gênica dos próprios co-ativadores, elevando assim o nível de RNAm em função da presença da proteína.

Esta habilidade significa que, mesmo obtendo redução efetiva com bloqueio e clivagem do RNAm, estes níveis poderiam não ser afetados caso a proteína iniciasse nova transcrição. Contudo, ao obtermos a redução da proteína no grupo ASO, pudemos confirmar que não há tradução do RNAm, resultando em baixa quantidade de proteína. Esta informação atua como suporte ao princípio de clivagem desempenhado pelo oligonucleotídeo antisense: uma vez que não há a presença do *template*, ou seja, do molde, a proteína não pôde ser sintetizada, sendo que tal fato pode ser devido à duas razões – ou pela complementaridade de ambas: o volume de ASO entregue à célula contém uma quantidade de sequências tal capaz de suportar a quantidade de RNAm já em produção

tanto quanto aquela que será produzida até que se reduzam efetivamente os níveis do *template* para nova proteína; assim como o fato do co-ativador apresentar um período de meia-vida curto – 20 minutos (Handschin, Spiegelman 2006) – o que significa um tempo curto de efetiva ação da proteína sendo capaz de iniciar nova síntese de RNA.

A sequência ASO, quando sintetizada, é acrescida de fosforotriato de modo a aumentar sua durabilidade dentro do ambiente celular evitando degradação imediata ou acelerada, de tal modo que a proteína co-ativadora presente antes da transfecção, durante seu tempo ação, não consegue transpor a “barreira” imposta pelo bloqueio com ASO em função da durabilidade, o que sustenta os níveis reduzidos de RNAm, impedindo nova tradução, apresentando como resultado final baixos níveis proteicos. Estes dados, contudo, ainda não significam que obtivemos sucesso com o protocolo de silenciamento.

Como mencionado anteriormente, silenciar um gene significa bloquear a tradução do RNAm, impedindo a formação e atividade da proteína resultante, afetando as funções metabólica/vias de sinalização dependentes de tal proteína. Até o momento observamos a redução do RNAm e da proteína, ficando portanto a necessidade de checar a atividade da proteína.

As proteínas da família PGC-1, como mencionado anteriormente, atuam como co-ativadores de transcrição gênica, ou seja, sua principal atividade está em recrutar e ativar proteínas necessárias para iniciar o processo de transcrição de RNAm de genes específicos; esta atividade ocorre principalmente através da ativação de complexos com atividade histona acetil-transferase, a exemplo do CBP/p300 – uma vez acetiladas, as histonas diminuem a intensidade de ligação com o DNA, permitindo expansão da cromatina, e portanto favorecendo a transcrição; além disso os co-ativadores PGC-1 também ativam proteínas iniciadoras do processo, podendo citar a RNA Polimerase II – responsável por realizar a ligação entre os nucleotídeos de RNA com base no molde de DNA – e ainda podem interagir com os fatores de transcrição, sendo responsáveis por dar continuidade à via de sinalização baseada em determinados estímulos, entre os quais podemos citar frio e jejum, como descrito (Knutti e Kralli, 2001; Liang e Ward, 2006).

Também é sabido que os membros da família PGC-1 possuem relação íntima com o metabolismo celular, estando ligados diretamente à manutenção do mesmo. O PGC-1 β interfere no controle metabólico celular através da regulação da transcrição, principalmente, de dois genes: NRF-1 e TFAM (Venditti et al., 2006).

O gene NRF-1 (Fator de Respiração Nuclear-1) é alvo direto da ação de PGC-1, sendo o primeiro gene cuja transcrição é regulada pelo co-ativador sob estimulação devido a exposição a baixas temperaturas, por exemplo (Liang e Ward, 2006); o NRF-1 é um gene-chave para ativação da cadeia de sinalização necessária para manter a respiração celular, atuando principalmente na estimulação de biogênese mitocondrial e regulação da fosforilação oxidativa, sendo capaz, inclusive, de desacopla-la do processo respiratório, aumentando a geração de calor em resposta ao frio, resultando em termogênese adaptativa.

Associado ainda ao NRF-1 e ao PGC-1 β temos a atuação do TFAM ou mtTFA (Fator de Transcrição Mitocondrial A), responsável pela regulação da produção de DNA mitocondrial através da estimulação da região promotora do DLoop mitocondrial (Scarpulla, 2008), o que por sua vez resulta na replicação do mtDNA (genoma mitocondrial). A transcrição de TFAM tem início uma vez que haja estimulação de NRF-1 por PGC-1 β , ou seja, a ativação do fator de transcrição NRF-1 também é dependente da sinalização pelo co-ativador, o que implica no fato da transcrição de TFAM também contar, novamente, com a atividade de PGC-1 β .

Os dados obtidos por Real Time PCR dispostos nas figuras 3 e 4 evidenciam a redução dos níveis de RNAm de ambos os genes diretamente dependentes do co-ativador para serem transcritos. Estes genes, conforme apresentado, se mostram intimamente ligados ao processo de obtenção energética pela célula, o qual é coordenado pela ação dos co-ativadores da família PGC-1, sendo sua redução resultado do abalo da função proteica da isoforma β , atuando como indicativo de sucesso no protocolo de transfecção adotado.

Buscando ainda observar os impactos da redução de atividade da proteína co-ativadora, buscando avaliar dois alvos cuja atividade fosse dependente de PGC-1 β de forma indireta, ainda relacionada ao processo metabólico da célula; utilizamos então o gene APOC3 e o Dloop do genoma mitocondrial.

O gene APOC3 (Alipoproteína C3) por sua vez se relaciona o metabolismo de lipídeos, inibindo a atividade lipoproteína lipase (LPL); de modo sintético, sabe-se ser a LPL responsável pela hidrólise de lipoproteínas e triglicerídeos, atuando como facilitadora da absorção destes componentes pela célula; a alipoproteína C3 também atua, em especial no fígado, na regulação do processo gliconeogênico a partir de substratos como triglicerídeos. A ativação do gene para transcrição da alipoproteína depende da co-ativação do HNF-4 (Fator Nuclear de Hepatócito 4) por PGC-1 β (Nikolaidou-Neokosmidou et al., 2006), de modo que expressão de APOC3 se torna PGC-1 β -dependente.

Uma vez posto que a ação destes genes auxilie da coordenação do metabolismo celular em relação direta com a expressão do co-ativador, assume-se que, havendo queda da função proteica do mesmo, a expressão destes também se encontraria reduzida; porém quanto à expressão de APOC3 notamos que há redução da mesma ao compararmos o grupo LIPO+ASO com o grupo LIPO, entretanto o mesmo fato não se observa quando comparamos ao grupo não tratado Tm5, além de podermos observar um aumento significativo da expressão no grupo LIPO+SO.

O que se avalia neste caso específico é a relação entre a via de transfecção utilizada – lipofectamina – e o papel do gene sendo avaliado. O reagente lipofectamina, como descrito, atua no *delivery* do oligonucleotídeo através do processo de fusão com a membrana celular, sendo portanto, uma estrutura lipoproteica exógena à célula; com isto em mente, temos a ideia do aumento de APOC3 em grupos cuja atividade de PGC-1 β não foi inibida uma vez que este seria o mecanismo de proteção da célula – a ativação de APOC3 leva ao impedimento de LPL, a qual iria facilitar a fusão da vesícula de lipofectamina com a membrana celular. Deste modo, havendo alterações significativas no grupo controle, possivelmente em decorrência da relação gene/lipofectamina, considerando ainda que não foram realizados experimentos que visassem aprofundar as ideias aqui relacionadas quanto a este gene especificamente, optou-se por não adotar a expressão de APOC3 enquanto sinalizadora da função de PGC-1 β , ainda que possível notar a redução da expressão gênica quando adotado o tratamento com ASO.

Quanto ao Dloop, o utilizamos como indicativo indireto da função de biogênese mitocondrial desempenhada pelo co-ativador. Descrevemos anteriormente ser o PGC-1 β responsável pela ativação do NRF-1, o qual por sua vez irá dar início à sequência de sinalização cuja finalidade está na replicação do mtDNA, resultando no aumento do número de mitocôndrias na bateria celular. O DNA mitocondrial compreende uma sequência circular, responsável pela produção de treze genes, ligados à cadeia de fosforilação oxidativa, organizado de forma sintética, sem a presença de íntrons; o mtDNA possui, entretanto, uma região não codificante, utilizada por fatores de transcrição como região promotora, formada pelo deslocamento da cadeia pesada do DNA.

Por ser um elemento marcante da estrutura do mtDNA e não conter sequências molde para transcrição, o Dloop desempenha o papel de indicador da quantidade de cadeias mitocondriais, sem que entretanto apresente elementos que atuem como indicativos na atividade mitocondrial no âmbito genético. Este fator se torna relevante na medida em que

buscamos avaliar o impacto do silenciamento sob a produção de novas mitocôndrias e não sob o aumento da atividade mitocondrial, fato que tem sido relacionado pela literatura à atividade de PGC-1 α (Moura et al. 2012).

A Figura 14 traz o resultado obtido com a quantificação de Dloop após o tratamento com antisense. Observa-se na figura não haver diferença na expressão do mesmo após a transfecção, não havendo diferenças significativas entre os grupos. Este dado permite colocar que não são encontradas alterações no número de mitocôndrias seja em células tumorais Tm5 sem tratamento ou no grupo que recebeu o ASO, significando não haver impacto na redução da expressão gênica sobre a biogênese mitocondrial. Este dado se mostra controverso àquele trazido nas figuras 8 e 9, uma vez que o NRF-1, gene iniciador da cadeia, e TFAM, gene promotor da replicação do mtDNA, se encontram com a expressão reduzida, fato este que deveria implicar no espelhamento dos dados trazidos nos gráficos anteriores.

Frente a tal dado, e buscando dar continuidade aos objetivos do trabalho, avaliamos em seguida, a proliferação das células após o tratamento com antisense, para que combinados os resultados pudéssemos avaliar as variáveis e propor uma relação entre os dados, contudo, cabe trazer neste momento que, feitas as ressalvas quanto à expressão da Alipoproteína C3, os dados obtidos trazem claro o impacto da redução da expressão de PGC-1 β sobre genes diretamente envolvidos com o co-ativador, indicando efetiva redução da ação proteica do mesmo, representando a confirmação do silenciamento gênico, desde a redução dos níveis de RNAm à atividade da proteína, e relativa eficiência do método de sinalização. De modo complementar, os dados obtidos com APOC3 abriram caminhos para que se buscassem outras formas de bloquear a ação do co-ativador, como será discutido adiante, assim como os níveis obtidos de Dloop, associados aos resultados de crescimento pós-transfecção, sugerem a possibilidade de vias clássicas mediadas por PGC-1 β serem capazes de interferir na relação metabolismo/proliferação.

Realizamos novamente a curva de crescimento das células tumorais Tm5 tratadas com o ASO. Utilizamos novamente os grupos controle LIPO e LIPO+SO e para fins de comparação foi realizada novamente a curva com as células tumorais sem qualquer tipo de tratamento, de modo que todos os grupos fossem mantidos simultaneamente em cultura, sob as mesmas condições.

Os gráficos trazidos na figura 15 mostram a variação de crescimento obtido em células tumorais após submissão à transfecção, revelando alteração no padrão de

proliferação do grupo LIPO+ASO quando comparado a todos os demais grupos experimentais. Observa-se que os grupos controle mantêm o período de dobramento em aproximadamente 24 horas após o plaqueamento, apresentando valor final de células em cultura de aproximadamente três vezes o número inicial (1×10^5) utilizado, reproduzindo a curva inicial obtida com Tm5, atuando também como forma complementar e assertiva dos dados iniciais. Contudo, o grupo LIPO+ASO descreve uma curva diferente dos demais, apresentando o número de células ao longo do tempo de experimentação similar ao número plaqueado, variando apenas no tempo 72 horas, o qual representa o período de dobramento para este grupo. Quando comparamos este gráfico com o realizado inicialmente e disposto na Figura 4 A percebe-se haver atingido no grupo transfectado com antisense padrão de crescimento similar àquele apresentando por melanócitos normais, cujo tempo de dobramento também ocorre após 72 horas.

A fim de poder relacionar estes dados de modo direto com o protocolo de transfecção, novamente utilizou-se como controle a exclusão por azul de Tripán, construindo o gráfico de sobrevivência das células, apresentado na figura 16. Percebe-se neste momento que todos os grupos apresentaram porcentagem de células viáveis de no mínimo 90%, indicando alta viabilidade celular, manutenção de condições de cultura e, neste momento, permite a sustentação dos dados de crescimento reduzido no grupo transfectado ser devido à ação do tratamento, inibindo a ação de PGC-1 β , uma vez que não se observa morte ou inviabilidade celular atuando como barreira ao crescimento.

Ao unir os fatos dispostos, apresentamos informações que estabelecem relação entre a expressão do co-ativador e a proliferação *in vitro* de células tumorais, sendo que a alta expressão de PGC-1 β afeta positivamente a capacidade proliferativa, levando à baixo tempo de dobramento e altas quantidades de célula, ao passo que o contrário também se torna verdadeiro: a redução da expressão do co-ativador afeta a capacidade proliferativa de maneira negativa, resultando no aumento do período de dobramento e, conseqüentemente, em menor número de células ao final da experimentação de contagem.

Mais efetivamente, estes dados nos permitem afirmar que sob condições normais de cultura, células tumorais não se mostram aptas a manter o nível proliferativo elevado após a atuação do ASO específico para PGC-1 β , deixando claro o envolvimento do co-ativador com a manutenção e continuidade do ciclo celular, sem que haja, entretanto, impacto na via metabólica diretamente associada à família PGC-1.

Buscamos na literatura descritores que nos permitissem associar todos os dados trazidos até o momento, em especial no tangente à via mediada por PGC-1 β e NRF-1, pois como descrito, o abalo do co-ativador reduziu a transcrição gênica do fator, impactando na proliferação, sem que se observe modificação na biogênese mitocondrial. Duas publicações se mostraram relevantes no esclarecimento destas informações, estabelecendo vias mediadas por PGC-1 capazes de alterar o ciclo celular e sua progressão sem haver, necessariamente, disfunção no metabolismo celular.

A primeira publicação em questão (Lin et al., 2001) na verdade trata da descrição inicial de PGC-1 β enquanto proteína diferente de PGC-1 α , estabelecendo a existência de ambas as isoformas. Ao descrever a atividade de PGC-1 β no momento inicial foi identificada a sua relação direta com o NRF-1, propondo, entretanto, a presença de um grupo funcional responsivo a HCF-1 (Host Cell Factor-1); esta ideia foi associada a princípio com um possível papel imunológico do co-ativador, uma vez que o HCF-1 também foi associado inicialmente à resposta celular frente à infecção viral. Contudo, recentemente o HCF-1 foi descrito como parte importante da cadeia de sustentação de proliferação celular (Mangone et al., 2010).

Este fator se mostrou capaz de modificar a atividade de histonas, permitindo compactação ou liberação do material genético, em função de ligações com sítios específicos do DNA. Além disto, a maquinaria celular é capaz de clivar o HCF-1, gerando duas subunidades: HCF-1_n e HCF-1_c. A primeira subunidade se mostrou fator promotor da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo, ao passo que a subunidade HCF-1_c atua orquestrando diversos aspectos da fase M do ciclo.

A atividade de HCF-1 se mostra associada à sua co-ativação por PGC-1 β , de modo que o Fator não requer o co-ativador para ser transcrito, porém é ligado ao mesmo quando se faz necessário para orquestrar o ciclo, o que significa dizer não ser ele PGC-1 β -dependente para transcrição – assim como são NRF-1 e TFAM – mas sim depende em sinalização celular. Uma vez reduzido o nível proteico do co-ativador, a chance ligação com o HCF-1 se torna também reduzida, podendo alterar a capacidade proliferativa da célula, sem que haja, necessariamente, influências diretas na sinalização metabólica também mediada por PGC-1 β .

A segunda publicação que sugere um envolvimento de PGC-1 β com o controle do ciclo celular (Scarpulla et al., 2008) descreve um segundo papel desempenhado pelo NRF-1. De modo clássico, o NRF-1 é associado à biogênese mitocondrial e indução da cadeia

respiratória, principalmente pela via de sinalização de TFAM e NRF-2 (Handschin e Spiegelman, 2006), contudo recentemente se avaliou a participação deste fator de transcrição na atividade gênica do conjunto de fatores E2F.

Foi demonstrado em tal publicação que há redução dos níveis de um subgrupo gênico responsivo à E2F através do tratamento com siRNA para NRF-1, indicando o envolvimento direto entre os fatores. Os produtos gênicos codificados pelos membros da família E2F cuja atividade foi reduzida em concomitância com a baixa expressão de NRF-1 foram associados à replicação do DNA e citocinese, auxiliando da progressão da mitose e, por consequência, da proliferação celular.

Discutimos anteriormente o fato do NRF-1 requerer a expressão de PGC-1 β para que possa ser transcrito, sendo demonstrada nos resultados deste trabalho a redução dos níveis gênicos de NRF-1 uma vez que haja tratamento com ASO para silenciar o co-ativador, tornando clara a relação de dependência entre os fatores, o que nos permite cogitar que a redução de NRF-1 dirigida pelo silenciamento de PGC-1 β pode resultar no abalo da cadeia de sinalização E2F dependente de NRF-1, o que estaria levando à redução da proliferação celular, sem que haja também nesta hipótese as implicações relacionadas à mitocôndria ou sinalização metabólica.

Uma vez que não avaliamos a expressão do HCF-1 ou de elementos responsivos à E2F não se pode afirmar se as hipóteses se sobrepõem ou coexistem, contudo, os dados aqui apresentados permitem que haja direcionamento para um destes cenários, considerando os trabalhos publicados e referências literárias sobre o envolvimento dos co-ativadores PGC-1 e seu papel na sinalização celular em modelos de câncer, assim como se torna relevante pensarmos que não houve detecção de redução nos níveis de PGC-1 α com o tratamento baseado em ASO; devemos lembrar a existência da sobreposição de funções entre as isoformas, sendo aquelas ligadas à regulação do metabolismo as mais imperativas na funcionalidade da família PGC-1, de tal modo que se torna plausível considerar haver uma sustentação da sinalização metabólica pela isoforma α . Outros autores já trouxeram hipóteses similares, colocando que existem funções que são desempenhadas apenas pela isoforma β , chegando a propor que a mesma poderia inclusive regular a expressão da isoforma α para determinadas funções, a exemplo da indução de MITF-m (Shoag et al., 2013).

Considerando a existência de vias de sinalização mediada por PGC-1 β que atuam de modo independente ou pouco se relacionam com a via clássica ligada ao metabolismo,

independentemente de não observarmos alterações nesta via, demonstramos a efetiva relação entre a expressão do co-ativador e a proliferação celular no modelo *in vitro*, o que nos permite pensar fortemente na existência também de um papel similar quando nos referimos à formação e progressão de tumores *in vivo*.

Esta ideia foi abordada e descrita na literatura de maneira extensiva para a isoforma α , tendo sido um dos trabalhos mais significativos até o momento publicado em 2011 (Bhalla et al. 2011), utilizando-se da indução ou supressão do co-ativador para verificar o efeito carcinogênico respectivo. Inoculando células Colo205 em camundongos SCID, os autores demonstraram haver redução de 60% do crescimento tumoral quando se faz um tratamento prévio com shRNA para PGC-1 α nas células. Cabe também ressaltar que no referido trabalho os autores não observam redução da proliferação celular *in vitro* com a utilização do mesmo tratamento.

No trabalho aqui discutido, utilizou-se uma abordagem diferente da referência supracitada para composição do modelo animal, porém também foi demonstrada a redução efetiva de tumores *in vivo* com o tratamento realizado. Estes resultados permitem que apresentemos dois pontos importantes que não foram abordados de tal maneira, até o momento, na literatura disponível.

O primeiro ponto ao qual devemos nos atentar está, justamente, no modelo utilizado; neste modelo experimental células Tm5 foram injetadas, sem receber nenhum tratamento preliminar, em camundongos C57/black, levando à formação de tumores nos flancos do animal, um no flanco direito e outro no esquerdo. Cada tumor recebeu injeções contendo o tratamento com ASO – de modo similar ao utilizado em cultura – ou contendo a sequência controle SO somente após o estabelecimento do volume mínimo de 0,25cm³. Neste protocolo, a sequência de tratamento é levada ao tumor por meio de injeções diretas, aplicadas em intervalos de 48 horas; uma vez que percebemos redução de aproximadamente 50% de crescimento tumoral concluímos haver alto nível de sucesso no *delivery* do antinsense por meio direto, o qual não havia sido abordado neste tipo de protocolo experimental até o momento, apesar da concepção estratégica em si ter sido utilizada anteriormente em outros modelos experimentais de câncer (Ko et al. 2009; Sun et al. 2013).

É importante ressaltarmos este fato, pois em publicações anteriores as células tumorais foram tratadas antes da inoculação e ainda que se tenha obtido resultado positivo e, de certo modo, tenha se formado base para pesquisas subsequentes, não se avalia em tais

pesquisas a eficácia do tratamento em tumores já formados; em linhas gerais, as pesquisas anteriores trabalham com hipóteses de modulação preventiva do co-ativador no tangente ao seu efeito carcinogênico em âmbito metabólico; o procedimento adotado, entretanto, aborda o controle da expressão do co-ativador β sob enquanto tratamento de tumores sólidos estabelecidos, sob o âmbito da proliferação celular, o que torna o modelo *in vivo* trazido uma nova abordagem ao estudo do melanoma e das formas de trata-lo, cabendo ressaltar que ainda avaliamos o tumor em estágio inicial, mesmo que estabelecido, o que implica no fato do tratamento não necessariamente apresentar resultados semelhantes em tumores avançados.

O segundo ponto que devemos considerar se relaciona intimamente com os levantamentos feitos anteriormente sobre a efetividade do protocolo *in vivo*. Destacamos a relevância da abordagem utilizada com o tratamento adotado *in vivo* no tangente à forma de *delivery*, porém neste segundo momento o que ganha destaque é a própria ação do ASO para PGC-1 β .

Já foi exposto anteriormente haver redução efetiva da velocidade de crescimento e também do volume final atingido pelos tumores tratados com antisense em aproximadamente metade quando comparados ao grupo controle. Estes dados podem ser efetivamente ligados à repressão de PGC-1 β uma vez que o resultado se torna amparado pela análise histológica das massas tumorais, de modo que a semelhança entre os níveis de necrose tecidual dos grupos analisados deixa clara não haver alterações morfo-histológicas que impliquem a redução do volume tumoral observada ser devida à morte do tecido, e consequente redução do número de células.

Em outros termos, não se pode atribuir a redução da massa tumoral aos traumas causados pela aplicação direta de injeções ou morte inespecífica das células tumorais. Consideramos ainda que cada animal recebeu ambos os tratamentos – SO no tumor lateral direito e ASO no tumor lateral esquerdo – de modo que as alterações encontradas também não se devem aos fatores de respostas individualizadas dos animais aos tratamentos isolados.

Frente a estes dados, trazemos a implicação direta da ação do PGC-1 β com o desenvolvimento de tumores *in vivo*, demonstrando que uma vez suprimida a sua ação, existe redução na capacidade proliferativa das células – como observado em cultura – implicando diretamente na redução da velocidade de crescimento tumoral.

Com estes procedimentos experimentais e dados coletados enveredamos um caminho pouco explorado pelas pesquisas atuais que envolvem a relação PGC-1/câncer. Conforme citações anteriores, os estudos atuais focam de modo mais extensivo na ação do PGC-1 α com o crescimento tumoral sob a ótica metabólica. Notavelmente descobertas acerca desta isoforma foram estabelecidas, demonstrando que há implicação direta da capacidade regulatória desta isoforma na síntese de ácidos graxos mediados pela enzima FAS, levando à biodisponibilidade de substrato para proliferação celular de modo a atuar como facilitador do desenvolvimento de câncer de cólon e fígado (Bhalla e col., 2011).

Descrevemos anteriormente também haver associação de modo direto entre a expressão aumentada de PGC-1 α em determinadas linhagens de melanomas humanos (Vazquez e col. 2013), as quais apresentam níveis menores de mortalidade quando comparadas à linhagens que apresentam baixa expressão do co-ativador, sendo tal fenômeno devido à proteção contra apoptose sinalizada por ROS, estando tal fato amparados pela presença e atividade de PGC-1 α . Em tal trabalho se demonstra ainda que a expressão elevada de PGC-1 α está implicada no deslocamento da via energética celular da via glicolítica para a respiração mitocondrial – inversão do efeito Warburg – com consequente aumento do estado de energia celular.

Novamente temos a não observância do PGC-1 β nos dois trabalhos referidos, contudo um fato se faz notável na última publicação: a indução do aumento da expressão de PGC-1 α em células tumorais-PGC-1 α negativas não é capaz de induzir a proliferação destas, a despeito de se observar aumento da morte celular quando se abala a expressão do co-ativador em células tumorais PGC-1 α positivas.

Ainda neste sentido, cabe ressaltar que ambas as publicações supracitadas (Bhalla e col., 2011; Vazquez e col., 2013) além de não considerarem os possíveis efeitos do PGC-1 β na via metabólica, também não tratam de outras vias mediadas por tal isoforma, as quais independem ou não sobrepõem funções do PGC-1 α , o que significa dizer que os estudos de maior relevância até o momento na relação PGC-1/câncer pouco exploram aspectos não metabólicos da mesma, sendo então considerável tratar da temática aqui proposta como um novo campo de interesse, revelando aspectos da atividade proliferativa de melanoma cuja abordagem foi pouco aprofundada, ou inexistente, em trabalhos anteriores.

Associando-se tais informações aos dados aqui apresentamos também retomamos então a proposição do controle fino de PGC-1 β sobre a proliferação por vias não metabólicas impactando na expressão de PGC-1 α : podemos hipotetizar que a isoforma β

seja capaz de induzir a proliferação por interferência nas vias HCF-1/NRF-1-E2F ou mesmo participação indireta no ciclo celular na indução de ciclinas (Buchakjian e Kornbluth, 2010), ao passo que o papel da isoforma α seria suportar metabolicamente a proliferação, permitindo maior aporte de energia e biodisponibilidade de substrato. Cabe ressaltar, novamente, que tais associações não foram experimentalmente avaliadas por nenhuma publicação até o momento.

Ainda pensando em pontos relevantes já destacados em literatura, nota-se o surgimento de pesquisas acerca de melanoma humano, assim como novas relações entre o processo melanogênico e sua ação pró ou contra tumorigênese. Sabe-se que a melanina atua como protetor do material genético frente aos danos causados por radiação UV, sendo sua formação o final de um processo, ainda não completamente conhecido, mediado principalmente por MITF. Conforme mencionado anteriormente, a regulação de MITF se mostrou dependente da ação de co-ativadores PGC. O que se destaca neste momento é o fato de linhagens de melanoma humano apresentarem altos níveis de PGC-1 α , decorrentes da indução por MITF (Vazquez et al., 2013), sendo associado a este dado a existência de polimorfismos no gene do PGC-1 β capazes de induzir pigmentação anormal em consequência da regulação deficiente de MITF, de modo que a capacidade de exibir pigmento também se torna um indicativo do risco de incidência de melanoma (Shoag et al., 2013).

Frente a tal relação, questionamos a participação do PGC-1 β em melanoma humano, pensando ainda na relação entre a expressão do co-ativador e capacidade de pigmentação. Realizamos a quantificação da expressão de PGC-1 β em cortes histológicos de melanoma humano por meio de Imuno-histoquímica utilizando como controle cortes histológicos de nevus. Os nevus são aglomerados de células pigmentadas, classificados como anomalias cutâneas e associados, quando displásicos, ao desenvolvimento de melanoma em 50% dos casos diagnosticados clinicamente. Por apresentar características semelhantes ao melanoma quanto à constituição de melanina, os nevus se tornam controles viáveis para avaliar o papel do PGC-1 β na indução de proliferação celular anormal e acelerado, uma vez que estes não apresentam tal característica, quando comparados a melanócitos normais. Foi observada notável diferença entre os padrões de coloração exibidos pelas amostras tumorais em relação aos controles após a IHQ contra PGC-1 β , sendo alta a concentração de marcação em áreas nucleares e perinucleares em cortes tumorais, indicando a presença do co-ativador. É importante salientar que somente tais

áreas de marcação devem ser consideradas para análise, uma vez que a proteína de interesse é funcional na região nuclear. Após a quantificação da área marcada percebe-se que há aumento de 3 vezes em relação ao grupo controle.

Este resultado se torna indicativo da participação efetiva de PGC-1 β no desenvolvimento tumoral de melanoma humano, não estando esta via necessariamente associada à via de melanogênese descrita para o co-ativador. Pode-se pensar que a despeito de se envolver na referida via, a sustentação da sinalização levaria à tumorigênese, sendo a regulação da via melanogênica um possível mecanismo de controle do desenvolvimento e proliferação dos melanócitos, se relacionando com o fato de polimorfismos de PGC-1 β também serem associados à redução em 20% dos riscos de melanoma (Shoag et al., 2013).

Por fim, aventurando a possibilidade de desmembramentos futuros do trabalho, notou-se que grande parte dos dados publicados utilizam como abordagem ao silenciamento gênico o shRNA. O tratamento com ASO se trata de uma metodologia primária quando se trata da supressão do gene; sua utilização, ainda que de maior facilidade experimental, apresenta restrições quanto à durabilidade do tratamento em cultura e, conseqüentemente, as respostas que se observam.

A duração aproximada da sequência de oligonucleotídeos sintéticos em cultura e de aproximadamente 72 horas, podendo ser aumentado em função da adição de fosforotioato, contudo sua penetrabilidade na célula se torna reduzido em função de tal alteração. O shRNA se torna uma abordagem mais interessante quando se pensa experimentos de longo prazo ou ainda no desenvolvimento de linhagens com determinada expressão reduzida permanentemente. Nesta abordagem, temos a inserção de um vetor bacteriano ou viral contendo a sequência codificante para o shot-hairpin de RNA que irá atuar como molde complementar ao RNAm da proteína de interesse, levando à seu reconhecimento e clivagem pelo complexo DICER.

O diferencial desta técnica está no fato da própria célula produzir a sequência de interferência, e estando esta ligada à região promotora forte, será produzida de modo constante, levando a manutenção dos níveis de shRNA no meio intracelular, garantindo o silenciamento por tempo indeterminado, levando ainda em conta que por se tratar de um sequência gênica em vetor viral esta pode ser inserida no próprio DNA, sendo portanto replicada na divisão celular, sendo expressa mesmo em células filhas, o que não ocorre necessariamente em tratamento com ASO – neste caso a sequência excedente não transfectada a princípio pode assim o ser quando novas células foram geradas, contando

não haver degradação deste no meio. Outro diferencial está na facilitação da transfecção por estar mediada por vetor biológico e, obviamente, por ter manutenção própria da célula, evitando a necessidade de constantes procedimentos.

Neste sentido, realizamos a transfecção de sequências shRNA contra PGC-1 β , totalizando quatro grupos diferentes (sequências de interferência 1 e 2 e sua combinação e sequência controle 4); cada sequência foi denominada experimentalmente de clone uma vez que sua obtenção se dá após inserção em plasmídeo bacteriano, o qual será clonado pela própria bactéria até que se obtenha volume para extração e purificação; também realizamos o experimento apenas com o veículo da transfecção (Attractene) como método complementar de controle.

Os resultados trazidos neste trabalho demonstraram haver redução significativa da expressão gênica com a utilização da sequência 2 em relação aos controles experimentais, havendo também pequena redução não significativa com a utilização da sequência 1. Buscando melhorar os resultados, almejando maior efeito de silenciamento, o tratamento também foi realizado com a transfecção simultânea das sequências 1 e 2 (Clone 1+2), sendo que neste último caso se observou redução maior do que 90% da expressão quando comparamos com os controles experimentais.

Estes dados são indicativos da eficácia também do protocolo utilizando shRNA como via de controle da expressão de PGC-1 β , apresentando inclusive melhor resposta, na situação de transfecção conjunta, em comparação ao protocolo inicial de ASO, implicando, teoricamente, na formação experimental de linhagem tumoral de melanoma com baixa expressão de PGC-1 β , abrindo possibilidades de estudo futuro quanto ao seu comportamento tanto em aspectos proliferativos quanto metabólicos, fornecendo novos alicerces para o estudo e tratamento do melanoma.

Em síntese, os resultados aqui descritos e discutidos são pertinentes e condizentes com as pesquisas de mesmo foco sendo conduzidas atualmente, sendo ainda que os dados propostos se mostram efetivamente similares à referências de grande impacto, particularmente Bhalla e col. (2011) e Vazquez e col. (2013), no tangente ao efetivo papel dos co-ativadores PGC-1 sobre o desenvolvimento do câncer, acrescentando ainda uma nova perspectiva ao focar na ação de PGC-1 β , ainda que se tenha o feito de maneira mais discreta e menos extensiva, porém apresentando ideias originais e propondo modelos experimentais também não propostos até o momento, culminando, como dito

anteriormente, no fornecimento de novas informações e possibilidades futuras no tangente a o desenvolvimento de melanoma e novas formas de tratamento de interesse científico.

7. Bibliografia

Arany, Z., H. He, et al. (2005). "Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle." *Cell Metab*1(4): 259-71.

Bertolotto C. (2013) "Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options." *Scientifica* (Cairo).

Bhalla, K., B. J. Hwang, et al. (2011). "PGC1alpha promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis." *Cancer Res*71(21): 6888-98.

Buchakjian, M. R. and S. Kornbluth (2010). "The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death." *Nat Rev Mol Cell Biol*11(10): 715-27.

Chang Y, Shao D1, Liu Y, Liu X, Zhu L, Cui Y, Cui A, Qiao A, Kong X, Liu Y, Chen Q, Gupta N, Fang F,.(2010) "PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR alpha." *Mitochondrion*.10(5):516-27

Chen, E. I., J. Hewel, et al. (2007). "Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases." *Cancer Res*67(4): 1472-86.

Cormio, A., F. Guerra, et al. (2009). "The PGC-1alpha-dependent pathway of mitochondrial biogenesis is upregulated in type I endometrial cancer." *Biochem Biophys Res Commun*390(4): 1182-5.

Dias, N. and C. A. Stein (2002). "Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms." *Mol Cancer Ther*1(5): 347-55.

Estall JL, Ruas JL, Choi CS, Laznik D, Badman M, Maratos-Flier E, Shulman GI, Spiegelman BM. (2009). "PGC-1alpha negatively regulates hepatic FGF21 expression by modulating the heme/Rev-Erb(alpha) axis." *Proc Natl Acad Sci USA*.29;106(52):22510-5

Feilchenfeldt, J., M. A. Brundler, et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and associated transcription factors in colon cancer: reduced expression of PPARgamma-coactivator 1 (PGC-1)." *Cancer Lett*203(1): 25-33.

Flaherty, K. T., J. R. Infante, et al. (2012). "Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations." *N Engl J Med*367(18): 1694-703.

Fritz, V. and L. Fajas (2010). "Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells." *Oncogene*29(31): 4369-77.

Giguère V. (2008) "Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors." *Endocr Rev.*29(6):677-96

Girnun GD. (2012) "The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer." *Semin Cell Dev Biol.*23(4):381-8

Gleyzer, N., K. Vercauteren, et al. (2005). "Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators." *Mol Cell Biol*25(4): 1354-66.

Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, et al. (2007). "Melanoma biology and new targeted therapy." *Nature*445(7130): 851-7.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell*144(5): 646-74.

Handschin, C. and B. M. Spiegelman (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism." *Endocr Rev*27(7): 728-35.

Hauschild, A. and Eggermont A.M. (2009). "Epidemiology of invasive cutaneous melanoma". *Ann. Of Oncology, Suppl* 6:1-7

Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *N Engl J Med*363(8): 711-23.

Jiang, W. G., G. Davies, et al. (2006). "Does the PGC-1/PPARgamma pathway play a role in Com-1/p8 mediated cell growth inhibition in prostate cancer?" *Int J Mol Med*18(6): 1169-75.

Jiang, W. G., A. Douglas-Jones, et al. (2003). "Expression of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) and the PPARgamma co-activator, PGC-1, in human breast cancer correlates with clinical outcomes." *Int J Cancer*106(5): 752-7.

Knutti, D. and A. Kralli (2001). "PGC-1, a versatile coactivator." *Trends Endocrinol Metab*12(8): 360-5.

Ko, Y. T., C. Falcao, et al. (2009). "Cationic liposomes loaded with proapoptotic peptide D-(KLAKLAK)(2) and Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide G3139 for enhanced anticancer therapy." *Mol Pharm*6(3): 971-7.

Lens, M. B. and M. Dawes (2004). "Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma." *Br J Dermatol*150(2): 179-85.

Liang, H. and W. F. Ward (2006). "PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism." *Adv Physiol Educ*30(4): 145-51.

Lin, J., R. Yang, et al. (2005). "Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP." *Cell*120(2): 261-73.

Lowell, B.B. and Shulman, G.I. (2005) "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes." *Science*307: 384–387

Massod, A. and Al-Jumaily, A. (2013) "Computer Aided Diagnostic Support System for Skin Cancer: A Review of Techniques and Algorithms". *Int J Biomed Imaging*.

Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelman, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). "Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.98: 3820–3825

Mirebeau-Prunier D., Le Pennec S., Jacques C., Gueguen N., Poirier J., Malthiery Y., Savagner F. (2010) "Estrogen-related receptor alpha and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria." *FEBS J*.277(3):713-25

Moura M.B., Vincent G., Fayewicz S.L., Bateman N.W. , Hood B.L., Sun M., Suhan J., Duensing S., Yin Y., Sander C., Kirkwood J.M., Becker D., Conrads T.P., Houten B., Moschos S.J. (2012). "Mitochondrial Respiration - An Important Therapeutic Target in Melanoma". *PLoS One*. 2012; 7(8)

Oba-Shinjo, S. M., M. Correa, et al. (2006). "Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment." *Neoplasia*8(3): 231-41.

Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., and Patsch, W. (2009). "Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha." *Biochem. J*.371: 89–96

Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2003). "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction." *Nature* 423(6939): 550-5.

Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." *Cell* 92(6): 829-39.

Raharijaona, M., S. Le Pennec, et al. (2009). "PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocytic thyroid tumours." *PLoS One* 4(11): e7964.

Ramanathan, A., C. Wang, et al. (2005). "Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(17): 5992-7.

Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J.C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2003). "Regulation of hepatic fasting response by PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 α in gluconeogenesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4012–4017

Rowe G.C., Jiang A., Arany Z. (2010) "PGC-1 coactivators in cardiac development and disease". *Circ Res* 107(7): 825–838

Savagner, F., D. Mirebeau, et al. (2003). "PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma." *Biochem Biophys Res Commun* 310(3): 779-84.

Shoag, J., R. Haq, et al. (2013). "PGC-1 coactivators regulate MITF and the tanning response." *Mol Cell* 49(1): 145-57.

Slipicevic, A. and Herlyn, M. (2012). "Narrowing the knowledge gaps for melanoma" *Ups J Med Sci* 117(2): 237–243.

Spiegelman, B. M., P. Puigserver, et al. (2000). "Regulation of adipogenesis and energy balance by PPAR γ and PGC-1." *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4: S8-10.

St-Pierre, J., S. Drori, et al. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." *Cell* 127(2): 397-408.

Summermatter, S., O. Baum, et al. (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor { γ } coactivator 1{ α } (PGC-1{ α }) promotes skeletal muscle lipid

refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway." *J Biol Chem* 285(43): 32793-800.

Sun, C., Q. Wang, et al. (2013). "Antisense MMP-9 RNA inhibits malignant glioma cell growth in vitro and in vivo." *Neurosci Bull* 29(1): 83-93.

Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. (2006). "Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation." *Cell Metab* 3(5):333-41.

Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* 324(5930): 1029-33.

Vazquez, F., J. H. Lim, et al. (2013). "PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress." *Cancer Cell* 23(3): 287-301.

Vega, R. B., J. M. Huss, et al. (2000). "The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes." *Mol Cell Biol* 20(5): 1868-76.

Venditti, P. and S. Di Meo (2006). "Thyroid hormone-induced oxidative stress." *Cell Mol Life Sci* 63(4): 414-34.

Wu, Zhidan, Puigserver Pere, Ulf Andersson, Chenyu Zhang, Guillaume Adelmant, Vamsi Mootha, Amy Troy, Saverio Cinti, Bradford Lowell, Richard C. Scarpulla, Bruce M. Spiegelman (2006) "Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1". *Cell* 98 (9):115-124

Yoon, J. C., P. Puigserver, et al. (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." *Nature* 413(6852): 131-8.